BAND 37, HEFT 2 DEZEMBER 1959

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 46 Abbildungen

1959
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 37 Heft 2 *S. 113—216 Berlin 1959*

Postverlagsort Berlin

N.C.
CRAM
M.M.
COMMONWEALTH MYCOLOGI
4 JAN 196

INHALT

Abhandlungen

TOMIYAMA, K., M. TAKAKUWA, N. TAKASE and R. SAKAI, Alteration of oxidative metabolism in a potato tuber cell invaded by *Phytophthora infestans* and in the neighbouring tissues. With 18 figures 113

GÄUMANN, E., und W. OBRIST, Über die Schädigung der Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten durch einige Welketoxine. Mit 7 Abb. 145

KRANZ, J., Einfluß der Vortemperatur auf die Pathogenität einiger Pilze und ihr Wachstum in vitro 159

BOSER, H., Einfluß pflanzlicher Virosen auf Stoffwechselfunktionen des Wirtes. III. Mitteilung. P/O-Quotienten und einige Fermentaktivitäten in Knolle, Keim und Blatt viröser Kartoffelpflanzen. Mit 2 Abb. 164

KEGLER, H., Untersuchungen über Virosen des Kernobstes. I. Das Apfelmosaikvirus. Mit 10 Abb. 170

GOODMAN, R. N., Observations on the Production, Physiological Activity and Chemical Nature of Colletotin, a Toxin from *Colletotrichum fuscum* Laub. With 3 figures 187

BÖHME, H., Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz von zwei verschiedenen Knollenselleriesorten gegenüber der Blattfleckenkrankheit (*Septoria apii-graveolentis* Dorogin). Mit 5 Abb. 195

Kurze Mitteilung

KEGLER, H., Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). Mit einer Abb. 214

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photogebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/Main, Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzes Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 27,80 DM **Einzelpreis 30,50 DM**

Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo, Japan

Alteration of oxidative metabolism in a potato tuber cell invaded by *Phytophthora infestans* and in the neighbouring tissues[1])

By

K. Tomiyama, M. Takakuwa, N. Takase and R. Sakai

With 18 figures

Introduction

In reviewing the many reports (Tomiyama, Takakuwa and Takase 1958, Farkas and Király 1958) concerning the mechanism of late blight resistance in the potato plant, one may reasonably be led to conclude that this resistance to late blight is closely connected with respiratory systems, especially the function of polyphenolases.

In almost all of the experiments hitherto conducted comparatively large blocks of tissues infected by the parasite were used. These blocks often contained both infected and uninfected cells, making it difficult to obtain a clear picture of the process of defence reaction from those experiments. Because of this, the present workers have attempted to distinguish between the respiratory behaviour of the cells infected by *Phytophthora infestans* and of the tissues neighbouring them. In the previous paper (Tomiyama et al. 1958), it was shown that the metabolic excitement in the tissues neighbouring the infected cells may be related to resistance. In this respect about ten cells starting from a cell next to the infected ones toward the inner tissue seem to be indispensable for enabling the tissues to bring about almost complete inherent resistance.

The present experiments were designed to determine first the alteration of oxidative metabolism in a potato tuber cell invaded by *Phytophthora infestans*, and second the terminal oxidase variations in tissues neighbouring the infected region.

[1]) Physiological studies on the defence reaction of potato plant to infection of *Phytophthora infestans* VII.

I. GENERAL METHODS

Throughout the experiments reported here, the isolates H_{101} (race 0) and H_{103} (race 1) were used as experimental materials. For convenience, however, they are called race 0 and race 1, respectively, in this report. Tubers used were of the varieties Hokkai No. 10 (gene R_1) which is resistant to race 0 and susceptible to race 1 of *P. infestans* and Irish Cobbler (gene r) which is susceptible to both races.

To compare the terminal oxidase activities of both races of *Phytophthora infestans* the following methods were employed. The fungal mats developed on liquid media were used for the respiratory experiments. The inoculum for liquid culture was obtained from the mats on a potato-glucose agar. The composition of the liquid media used is as follows. A mixture of 200 g. potato tuber and 1 l tap water was boiled and extracted. 20 g. sucrose was added and thereafter sterilized intermittently at 100 °C. for four successive days.

Prior to the attainment of maximal growth of the fungal mat, respiration measurements were made. This maximum was reached in 2—3 weeks of incubation at 19 °C.

Since the growth of fungal mat of race 1 usually lagged one week behind that of race 0, mats showing the same rate of growth were chosen as the experimental materials. After the mats had been kept in distilled water for six hours, discs were cut out of the mats with a cork-borer (8 mm in diameter). The oxygen uptake of mats thus prepared was measured at 25 °C., after being suspended in 1/20 M pH 6.5 phosphate buffer to which glucose was added in the chamber of a Warburg respirometer.

Cell-free materials for testing were prepared as follows: after the fungal mats had been washed in water, the excess water was absorbed by filter paper and the mats then ground with sea sand or glass powder in a cooled mortar to which was added 1/20 M pH 6.5 phosphate buffer. After centrifuging the ground material (about 1000 r. p. m./5 min.), the supernatant was used for testing.

The cytochrome oxidase activity of the homogenate was determined by measurement of O_2-uptake in a Warburg respirometer, using hydroquinone

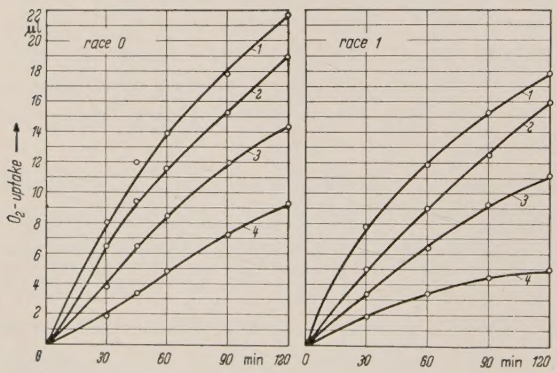


Fig. 1. Activity of homogenate + Cytochrome C on hydroquinone. 1. Cytochrome C + hydroquinone; 2. Cytochrome C + hydroquinone + 10^{-2} M KCN (10^{-3} M at final dil.); 3. Hydroquinone; 4. homogenate only

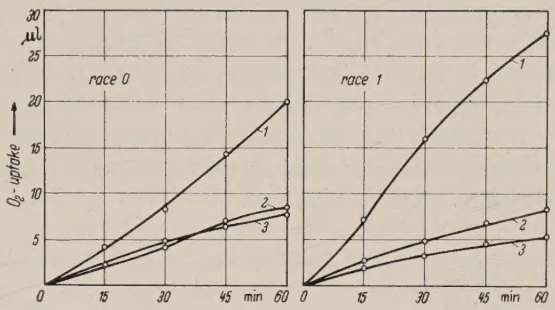


Fig. 2. Effect of KCN and NaN_3 on the O_2-uptake of hyphae of *Phytophthora infestans*. 1. no inhibitors; 2. 10^{-2} M KCN (10^{-3} M at final dil.) added; 3. 10^{-1} M NaN_3 (10^{-2} at final dil.) added

as the substrate. Cytochrome C was prepared by the method of KEILIN and HARTREE. The main chamber of the Warburg respirometer was filled with 1.0 cc homogenate, 0.5 cc of cytochrome C, 0.5 cc substrate and 5×10^{-2} M pH 6.5 phosphate buffer.

For the inhibition of respiration, the main chamber was supplied with 1.0 cc of homogenate, 1 cc of 5×10^{-2} M phosphate buffer and 0.5 cc of 3×10^{-2} M glucose as substrate. One of the side arms held 0.2 cc of 10 % KOH and the other held 0.5 cc of an inhibitor.

In order to determine the alteration of respiration in a cell invaded by *Phytophthora infestans*, measurements were made of the respiration of thin tuber slices, both sides of which were inoculated with strong spore suspensions of the fungus. The concentration of zoospore suspension used for inoculation was checked by means of Thoma haemacytometer, and recorded as the number of zoospores in one microscopic field (Olympus 15×40). In preliminary experiments, it was found that the spraying of slices with the zoospore suspension, concentration "200", at the rate of 3.2 cc per 100 cm^2 was sufficient to cause the infection of nearly all of the cells in the slices. The relationship between the concentrations of zoospores inoculated and the percentages of infected cells is shown in Figure 3. The raw zoospore suspension obtained from the cut surface of fresh potato tuber was centrifuged for the purpose of washing and concentrating and, after inducing indirect germination at 12 °C, the suspension was again centrifuged to eliminate ungerminated zoosporangia.

Slices were prepared from blocks of potato tuber tissue by cutting out plugs with a cork-borer 22 mm in diameter and then cutting with a microtome into slices 0.45 mm thick. These slices consisted of about 2.6 cell-layers on the average. The discs thus made were treated in three different ways: they were inoculated 1) immediately after washing with water for a short period, 2) after being immersed about 16—20 hours in water aerated by means of a suction pump at about 15 °C., and 3) after having been maintained aerobically in a Petri dish for about 18 hours at about 15 °C., following short water washing. Twenty minutes after spraying, the slices were turned over and sprayed again with the zoospore suspension.

No definite conclusion could be drawn from these experiments as to the respiratory excitement at an early stage of infection unless the following

three prerequisites are fulfilled. The first is that the speed of penetration of zoospores into host cells must be about the same for the two races. The second is that the respiratory rates of the two races must be identical in so far as possible. The third is that the time elapsed from penetration to death of invaded cells must also be identical for the two races. In order to determine whether these prerequisites are fulfilled or not, the following experiments were carried out.

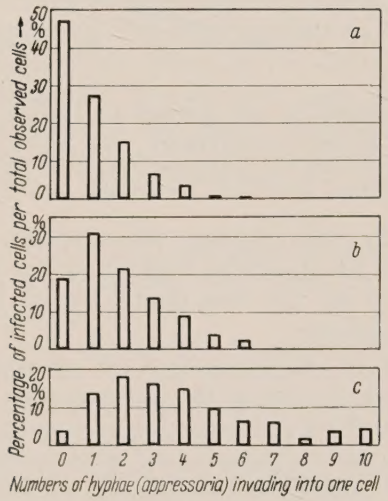


Fig. 3. Percentages of infected cells per total number of observed cells in the surface cell layer of a slice which was inoculated with different concentrations of zoospore suspension. Remarks: a) Inoculated by spraying the spore suspension having concentration of 100 zoospores per one microscopical field of Thoma haemacytometer (number of cells observed was 248); b) 150 zoospores (number of cells observed was 304); c) 200 zoospores (number of cells observed was 176)

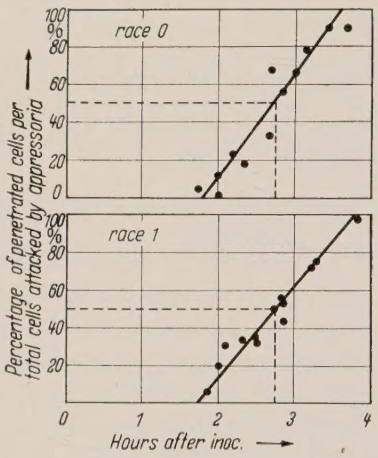


Fig. 4. Comparison of time required for races of *P. infestans* used in present experiments to penetrate into the cells of the potato tuber discs (variety: Hokkai No. 10)

To determine the time required for the penetration of both races, microscopic observations of cell penetration by appressoria were made at certain intervals after inoculation. From the graph (Fig. 4) obtained by plotting the percentages of penetrated cells per total cells attacked by appressoria as ordinates and time as abscissas, it appears that there is no difference in the penetration time between race 0 and race 1. As described in a later section, no definite difference was found in the respiratory rate and terminal oxidase activity between race 0 and race 1 used in these experiments. Tissue discoloration and microscopic observation of protoplasmic streaming after vital staining with neutral red showed that in discs infected soon after slicing (preparative method 1, above), no dead cells were observable within seven hours of inoculation. The dead cells, however, gradually began to appear seven to nine hours after inoculation, and fifty per cent of the infected cells

usually were dead fourteen hours after inoculation. In the case of slices kept in air before inoculation (preparative method 3, above), dead cells were not observed within five hours after inoculation; these infected cells usually began to die about six and one half hours after inoculation, and about fifty per cent of the infected cells appeared to die eight or nine hours after inoculation. With slices washed for about sixteen to twenty hours in water (preparative method 2, above), death of infected cells was delayed considerably when compared with slices maintained aerobically. In other investigations (TOMIYAMA 1957, unpublished) it was shown that the hyper-sensitive death of infected cells seems to be hastened when they are active metabolically. The above mentioned results seem to coincide with this phenomena (a precise report will be given in another paper). These observations seem to meet the above described prerequisites for the present experiments.

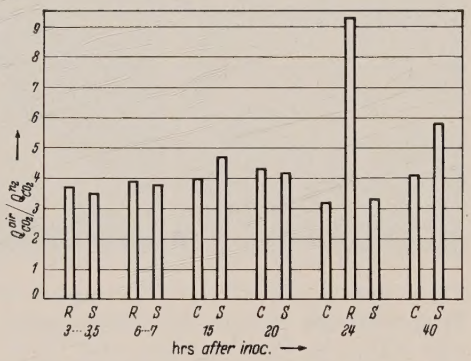


Fig. 5. $Q_{CO_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ take off of thin slices (Hokkai No. 10), both sides of which were infected by *P. infestans*. Remarks: C = Control, uninfected; R = Slices infected by race 0; S = Slices infected by race 1

To determine the respiratory changes in the tissue neighbouring the infected region, the following experiments were carried out. A zoospore suspension of concentration "100" was inoculated on the exposed surface of tuber cut into halves.

According to microscopic observation, in the case of uninfected tuber only the superficial cell wall of the cut surface cells turned brown, but in the case of a tuber infected by an incompatible race, usually one cell, but rarely two or three cells, turned brown owing to hypersensitivity (Fig. 6). To learn how far the hyphae developed into the tissue when the cut surface was inoculated with a compatible race, tubers were sliced successively from the cut surface toward the inner tissue and the slices thus obtained were kept moist in a Petri dish. These slices were subsequently examined for spore production. This technique indicated that one day after inoculation the hyphae penetrated into the 2nd or 3rd slices (the 5th to 8th cell from cut surface), and two days after inoculation they penetrated into the 4th or 5th slices (the 10th to 13th cell from cut surface). Three days after inoculation, it was found that all the slices of which the respiration was examined had been invaded by fungus.

At various times after inoculation, a plug of tuber tissue was removed from the cut surface at a right angle by a cork-borer 22 mm in diameter, and slices 0.45 mm thick were prepared with a microtome from the cut surface toward the inner tissue, consecutively. Slices thus made consist of

about 2.6 living cell layers on an average. The thickness of the slice was employed as a unit indicating a distance from the cut surface to the inner locus concerned and was called "L". The slices were washed in running tap water for about thirty minutes.

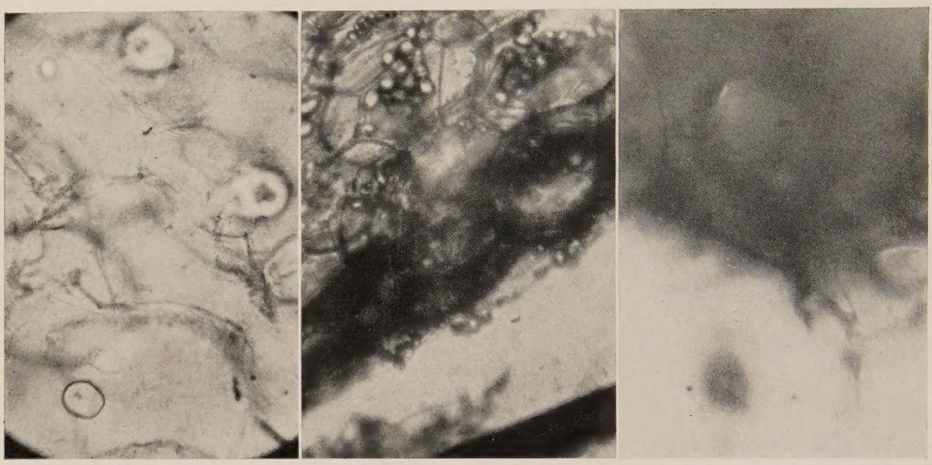


Fig. 6. Responses of the cut surface tissue of potato tuber to cutting (left), to infection by incompatible race of *Phytophthora infestans* (middle), and to infection by compatible race (right). In the left picture, only the outer cell wall turned out brown, but in the middle one cell layer

The respiration of the slices was measured by means of a Warburg respirometer under the influence of specific inhibitors. On the basis of the results obtained in extensive preliminary experiments (TAKAKUWA, TOMIYAMA and KATO, unpublished), the slices were suspended in Teorell and Stenhagen buffer solutions of pH 7.0 for inhibition experiments by HCN, pH 4.5 for those by malonate and pH 5.2 for the other experiments. As no distinct difference was found in the respiratory rate between buffer solutions of pH 4.5 and 7.0, the pH 5.2 buffer was employed as a liquid medium for the untreated controls. The concentration of KCN was 10^{-3} and 10^{-4} M and that of malonic acid was 5×10^{-2} M. In inhibition experiments using KCN, the side arm contained a KCN-KOH mixture to absorb CO_2. For the carbon monoxide inhibition experiments, the slices were suspended in Teorell and Stenhagen buffer at pH 5.2 in Warburg flasks filled with a 95 % CO and 5 % O_2 gas mixture. As a control a gas mixture containing 95 % N_2 and 5 % O_2 was used with slices. Blanks were run without slices to minimize any error resulting from a reaction of CO with the KOH solution in the side arm.

To test the effect of metabolic products of *Phytophthora infestans* on the respiration of potato tuber slices, the following method was employed.

The potato-glucose liquid medium, the composition of which was described above, was used for the culture of *P. infestans*. The culture broth of

both isolates race 0 and race 1 was filtered through filter paper fifteen to seventy hours after inoculation. After acidification of the filtrate to pH 6.0—6.1, a ten ml. aliquot was placed in a 9 cm. Petri dish. Thirty slices, 0.45 mm thick, were placed in the filtrate in three concentric circles of overlapping slices to that about one third of the upper surface of each slice was exposed to the air. Seventeen hours after immersion the slices were washed in water and used for respiratory measurements.

To determine whether or not quinones were responsible for the observed effect upon respiration of slices when uncultured media were used, a small amount of potato tuber juice was added to the culture media, thereby oxidizing any quinones, that may be produced. To minimize the influence of bacterial action, these operations were carried out in a cold room.

II. EXPERIMENTAL

1. Comparison of terminal oxidase activities of both races of *Phytophthora infestans*

The comparison of terminal oxidase activities of both races concerned in these investigations was carried out because respiration measurements on tissue infected with the fungus included the contribution by the parasite even though its contribution may be small compared with that of the host cells.

Although some difference was often observed between the total O_2-uptake of the two races, such difference seems to be conditional rather than essential, because each race showed a greater or a smaller O_2-uptake than the other race depending upon the circumstances.

Figure 1 shows that the addition of cytochrome C to the homogenates caused increases in the oxidation of hydroquinone in the case of both race 0 and race 1. The experimental results graphically presented in Figures 1 and 2 show no significant differences between the percentage inhibition of respiration of the two races by the metallo-enzyme inhibitors, KCN and CO. These results suggest that the cytochrome oxidase and polyphenolases play a part as terminal oxidases. Spectrophotometric examination of the homogenates of these races showed that the cytochromes *a* and *c* were present[1]).

However, as for the validity of the above described methods in identifying the terminal oxidase, some criticism has been presented. Therefore it is difficult to draw a definite conclusion from the present experiments concerning the nature of the terminal oxidase. It seems certain, however, that there is no distinct difference between the terminal oxidase activity of the two races used in the present experiments. Further studies on the nature of terminal oxidase of *Phytophthora infestans* are being carried out in our laboratory.

1) We would like to express our thanks to Prof. USAMI and Dr. WAKE for their advice.

2. Changes in a cell infected by *Phytophthora infestans* at an early stage of infection

a) Changes in respiratory rate

In order to determine the change of respiration in a potato tuber cell, both sides of a potato tuber disc (0.45 mm thick) consisting of two to three cell layers (average 2.6 cells) were inoculated with strong zoospore suspensions of incompatible and compatible races of *Phytophthora infestans*. Results obtained from the experiments on the slices infected soon after slicing are shown in Table 1 and those from experiments on slices immersed in water for about 16—20 hours are shown in Table 2. It appears that the respiratory rate is higher in the tuber slices inoculated with the incompatible race (race 0) than in those inoculated with the compatible race (race 1) in an early period of infection before cell death has occurred.

Table 1

O_2-uptake of a disc, inoculated by *Phytophthora infestans* soon after slicing and washing in running water for a short period, at an early stage of infection (μl/g. fr. wt./15 min.)

Inoculated with		Hrs. after inoculation		
		4	6	9
Experiment 1	Cont.	15.6	22.1	—
	Race 0	21.2	28.6	—
	Race 1	17.3	28.1	—
Experiment 2	Cont.	14.0	18.7	26.0
	Race 0	18.6	22.2	29.8
	Race 1	17.4	21.7	24.6
Experiment 3	Cont.	12.5	13.7	15.7
	Race 0	16.2	20.7	24.9
	Race 1	16.4	16.4	20 2
Experiment 4	Cont.	19.1	21.9	26.0
	Race 0	19.0	25.7	26.3
	Race 1	18.2	23.0	25.1
Averages	Cont.	15.3	19.1	22.6
	Race 0	18.8	24.3	27.0
	Race 1	17.3	22.3	23.3

To ascertain furthermore whether the enhanced O_2-uptake is due to the physiological activity involved in the resistance-reaction or, independently of resistance, to the specific nature of race 0, sliced tubers of Hokkai No. 10 (R 1) and Irish Cobbler (r) were inoculated with race 0 and with race 1. The results are shown in Table 3. There seems to be no significant difference in the respiratory stimulation between slices of Irish Cobbler whether infected by race 0 or by race 1. In Hokkai No. 10, however, the respiratory rate of the slices infected by race 0 was higher than that of those infected by race 1. This result suggests that in living cells of a potato plant the respiratory stimulation may be related to the process of resistance to *Phytophthora infestans*.

Table 2

Respiration of a potato tuber disc, inoculated with *Phytophthora infestans* after washing in water for about 15 hours, at an early stage of infection (μl/g. fr. wt./15 min.)

Inoculated with	Hrs. after inoculation								
	0			3			6		
	O_2-uptake	CO_2-output	RQ	O_2-uptake	CO_2-output	RQ	O_2-uptake	CO_2-output	RQ
Experiment 1 Cont.				47.2	45.8	0.97	45.6	45.3	0.99
Experiment 1 Race 0 (R)				45.5	46.0	1.01	54.4	55.2	1.02
Experiment 1 Race 1 (S)				43.5	43.7	1.00	44.4	47.1	1.06
Experiment 2 Cont.	32.0	30.2	0.94	37.0	37.4	1.01	37.0	33.9	0.92
Experiment 2 Race 0 (R)				38.4	37.8	0.99	48.4	45.8	0.95
Experiment 2 Race 1 (S)				41.4	35.8	0.87	42.3	40.4	0.96
Experiment 3 Cont.	28.5	31.5	1.11	27.7	26.7	0 97	30.5	29.7	0.97
Experiment 3 Race 0 (R)				32.7	32.3	0.99	39.3	38.4	0.98
Experiment 3 Race 1 (S)				27.2	27.3	1.00	35.7	35.1	0.98
Average Cont.	30.3	30.9	1.03	37.3	36.6	0.98	37.7	36.3	0.96
Average Race 0 (R)				38.8	38.7	1.00	47.4	46.5	0.98
Average Race 1 (S)				37.3	35.6	0.96	40.8	40.9	1.00

Table 3

O_2-uptake of the tuber discs of Hokkai No. 10 and Irish Cobbler inoculated with race 0 and race 1

potato varieties	Hokkai No. 10				Irish Cobbler			
Hrs. after inoculation inoculated with	Cont.	race 0 (R)	race 1 (S)	race 0 / race 1	Cont.	race 0 (R)	race 1 (S)	race 0 / race 1
1st experiment 3h.	22.0	27.1	24.9		32.9	33.5	37.6	
	22.5	27.2	27.1		33.3	35.5	35.1	
	20.0	27.4	23.4		30.0	34.5	29.5	
1st experiment (M)	21.5	27.2	25.1	1.08	32.1	34.5	34.1	1.01
1st experiment 5h.	—	29.5	28.1		32.6	38.4	37.8	
	25.8	31.8	30.0		33.9	40.8	41.1	
	24.1	29.9	28.3		33.1	38.6	35.0	
1st experiment (M)	24.4	30.4	28.8	1.05	33.2	39.3	38.0	1.03
2nd experiment 3h.	23.9	29.9	26.5		32.4	35.5	36.8	
	22.4	29.4	26.1		31.4	30.4	36.0	
2nd experiment (M)	23.1	29.6	26.3	1.13	31.9	33.0	36.4	0.91
2nd experiment 5h.	26.4	33.1	31.7		34.0	38.6	36.2	
	27.5	30.9	29.8		31.8	37.4	37.8	
2nd experiment (M)	27.0	32.0	30.7	1.04	32.4	38.0	37.0	1.03
3rd experiment 3h.	24.2	27.0	24.9		34.6	36.0	35.2	
	23.5	26.4	23.9		29.4	30.5	33.0	
	23.6	26.8	25.6		29.1	33.5	33.0	
3rd experiment (M)	23.8	26.7	24.8	1.08	31.0	33.3	33.8	0.99
3rd experiment 5h.	27.0	30.9	31.6		34.3	36.7	38.0	
	25.7	30.1	27.6		32.5	35.1	37.3	
	24.3	28.9	26.9		33.1	33.4	34.8	
3rd experiment (M)	25.7	29.9	28.7	1.04	33.3	35.1	36.7	0.96

To determine the influence of the concentration of zoospore suspension used upon the respiratory changes of infected slices, the slices maintained aerobically in Petri dishes for about 18 hours (preparative method 3) were inoculated with zoospore suspensions of different concentrations. The results are shown in Tables 4 and 5. In the slices inoculated with the densest zoospore suspension where nearly all of the tuber cells were infected, the O_2-uptake of resistant slices was more accelerated than that of susceptible slices immediately after penetration. When the slices were inoculated with lower concentrations of zoospores, where about fifty per cent of the host cells were infected, the acceleration in O_2-uptake of resistent slices took place relatively later.

Table 4

O_2-uptake of potato tuber discs, which were inoculated with different concentration of zoospore suspension of *Phytophthora infestans*, at an early stage of infection (μl/g. fr. wt./15 min.)

Spore concentration		100		150		100	
inoculated with Hrs. after inoculation		race 0 (R)	race 1 (S)	race 0 (R)	race 1 (S)	race 0 (R)	race 1 (S)
3h. 15min.	1st experiment	24.0	24.3	27.6	25.4	29.4	18.0
	2nd experiment	23.5	22.8	23.8	21.2	29.6	23.1
	3rd experiment	20.9	21.4	24.7	23.7	23.3	20.5
	4th experiment	23.4	22.1	24.7	22.6	20.4	25.3
	5th experiment	22.8	22.7	21.3	24.5	24.8	22.2
	6th experiment	22.7	22.0	23.0	22.0	23.4	21.4
	Means	22.9	22.6	24.2	23.2	25.2	21.8
5h. 00min.	1st experiment	34.0	27.0	33.8	27.8	35.9	31.2
	2nd experiment	28.1	25.6	21.3	20.1	23.8	21.9
	3rd experiment	26.0	24.5	22.6	28.2	28.7	24.7
	4th experiment	30.1	28.3	31.7	28.7	31.0	33.1
	5th experiment	25.5	24.0	24.6	24.5	25.4	23.9
	6th experiment	27.8	26.5	28.3	26.5	28.3	28.1
	Means	28.6	26.0	27.1	26.0	28.9	27.2

Table 5

The ratio of O_2-uptake of the discs inoculated with race O (R) to that of those inoculated with race 1 (S)

(calculated from table 3) $\frac{\text{inoculated with race 0}}{\text{inoculated with race 1}}$

Hrs. after inoculation	Spore conc.		
	100	150	200
3h. 15min.	1.01	1.04	1.16
5h. 00min.	1.11	1.04	1.07

In the latter case, the increase in the respiration of the infected cells may be moderated by the normal respiration of the uninfected cells present. The CO_2-output was also accelerated in resistant slices (Tables 2 and 6). It should be stated, however, that some exceptional cases were observed in

which the respiration of resistant tissue was somewhat smaller than that of susceptible tissue. It may be possible that excessive infection of a cell by the incompatible race causes the decrease of respiration. This relation must be clarified in the future.

Table 6

R.Q.s of the discs inoculated with race 0 and race 1 of *Phytophthora infestans* at an early stage of infection

Hrs. after inoculation	Items										
	O_2-uptake			CO_2-output			R.Q.			race 0 (R) / race 1 (S)	
	inoculated with										
	Cont.	race 0 (R)	race 1 (S)	Cont.	race 0 (R)	race 1 (S)	Cont.	race 0 (R)	race 1 (S)	O_2-uptake	CO_2-output
2h. 40min.	21.5	23.7	24.9	18.7	22.0	23.3	0.87	0.93	0.94	0.95	0.94
	18.7	22.4	22.4	17.8	22.1	23.0	0.95	0.99	1.03	1.00	0.96
	19.9	24.2	23.7	19.5	22.1	22.1	0.98	0.91	0.93	1.02	1.00
(M)	20.0	23.4	23.7	18.7	22.1	22.8	0.93	0.94	0.97	0.99	0.97
4h. 30min.	23.1	28.8	25.1	22.6	27.8	22.2	0.98	0.96	0.88	1.15	1.25
	21.3	29.7	25.1	19.5	28.1	23.0	0.92	0.95	0.92	1.18	1.22
	23.9	28.5	26.9	23.1	29.9	26.3	0.97	1.04	0.98	1.06	1.14
(M)	22.8	29.0	25.7	21.7	28.6	23.8	0.96	0.98	0.93	1.13	1.20

Table 7

Inhibition of O_2-uptake of thin slice, both sides of which were infected by dense spore suspension by cyanide

Date of Experiment	No. of spores inoculated	Conc. of Cyanide	inoculated with.	Percentage inhibition %		
				3 hrs.[2])	5 hrs.	7 hrs.
12. Dec.	150	10^{-4}	Control	36.0	37.1	33.1
			race 0 (R)	22.9	16.6	20.2
			race 1 (S)	35.0	38.3	31.9
24. Dec.	140	10^{-3}	Control	71.8	43.9	49.5
			race 0 (R)	76.1	48.7	21.5
			race 1 (S)	76.4	52.0	35.1
26. Dec.	160	10^{-3}	Control	50.8	48.8	52.1
			race 0 (R)	44.7	37.1	36.3
			race 1 (S)	49.4	44.7	36.9
14. Jan.	170	10^{-4}	Control	35.6	23.9	39.5
			race 0 (R)	35.5	13.9	−5.8
			race 1 (S)	21.4	15.8	15.3
17. Jan.	200	10^{-3}	Control	42.6	47.6	45.5
			race 0 (R)	43.8	44.7	32.3
			race 1 (S)	48.1	43.2	44.2

[1]) Number of spores in a microscopic field of the haemacytometer.
[2]) Time after inoculation.

b) Changes in terminal oxidase activity

The results obtained in inhibition experiments employing KCN are shown in Table 7. No decisive conclusion was obtainable as to whether or not the accelerated respiration at an initial period of infection in resistant tissues was mediated by metalloenzymes. It appears certain, however, that the cyanide-sensitivity gradually dropped thereafter, and seems to have been replaced by a cyanide-resistant enzyme system at a final stage of hyper-sensitivity when some of the infected cells began to die. In the slices infected by a compatible race, on the contrary, such a distinct tendency was not observed, but varying results were obtained in each of the experiments conducted within seven hours after inoculation. It may be conjectured that in an initial period of infection the respiration is unstable. As shown in Table 8, from fifteen to twenty-three hours after inoculation the cyanide sensitivity of the respiration of the slices infected by a compatible race (race 1) was almost the same as that of a control. Thereafter, however, when the death of infected cells was about to occur, the cyanide sensitivity decreased.

Table 8 also shows that the malonate sensitivity of O_2-uptake of the susceptible slices invaded by the parasite is almost the same as that of

Table 8

Inhibition of O_2-uptake of thin slices (Hokkai No. 10) both sides of which were infected by dense spore suspension, by cyanide and malonate

No. of Experiment / Date of Experiment		1st Experiment 10—13, Feb.				2nd Experiment 13—14, Feb.	
Hrs. after inoculation		18	23	42	54	24	29
Infected by race 1 (S)	Total O_2-uptake[1]	3.62 3.56	4.36 4.57	— —	— —	4.73 4.45	5.28 4.95
	mean	3.59	4.47	—	—	4.59	5.11
	Percentage inhibition by malonate (%)	51.50	53.93	—	—	37.7	33.55
	Percentage inhibition by KCN, 10^{-3} M (%)	61.98	62.84			30.54	30.88
uninfected Control	Total O_2-uptake	3.18 4.05	4.36 4.43	4.36 4.71	5.12 4.71	4.21 4.50	4.36 4.34
	mean	3.62	4.39	4.54	4.92	4.36	4 35
	Percentage inhibition by malonate (%)	49.72	38.67	21.98	46.0	33.0	34.64
	Percentage inhibition by KCN, 10^{-3} M (%)	59.01	55.05	26.23	26.38	56.10	57.36

[1] μl/100 mg. f. wt./15 min.

uninfected ones during the period in which the host and parasite are symbiotic. In slices infected by the compatible race, the infected cells usually began to degenerate about thirty or forty hours after inoculation. The results obtained from the experiments on the relation between aerobic and anaerobic CO_2-output of infected slices are shown in Table 9 and Fig. 5.

Table 9

$Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ of thin slice (Hokkai No. 10), both sides infected by *Phytophthora infestans*

No. of Experiment	Date of Experiment	inoculated with	Spore Conc. inoculated	Time after inoc. (Hrs.)	pH of Buffer	O_2-uptake in air[1])	R.Q.	$Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$
1st	20, Dec.	Cont.	—	24	5.2	4.59	1.01	3.2
		race 0 (R)	60			7.00	0.99	9.3
		race 1 (S)	60			4.39	0.96	3.3
2nd	24, Jan.	race 0 (R)	200	3	5.2	3.90	1.05	4.3
		race 1 (S)	200	3		3.52	1.08	3.9
		Cont.	—	5		3.08	1.09	3.7
		race 0 (R)	200	7		3.55	1.05	4.4
		race 1 (S)	200	7		3.67	1.03	4.5
3rd	28, Jan.	race 0 (R)	200	3	4.5	3.04	1.13	2.6
		race 1 (S)	200	3		2.99	1.06	2.6
		race 0 (R)	200	6		3.52	1.12	3.5
		race 1 (S)	200	6		3.26	1.08	3.2
4th	31, Jan.	race 0 (R)	200	3.5	5.2	3.38	1.01	4.3
		race 1 (S)	200	3.5		3.28	1.00	4.0
		race 0 (R)	200	6		3.85	0.94	—
		race 1 (S)	200	6		3.94	0.82	—
5th	4—5, Feb.	Cont.	—	15	5.2	3.89	1.07	4.0
		race 1 (S)	100	15		3.92	1.01	4.7
		Cont.	—	20		4.14	1.02	4.3
		race 1 (S)	100	20		4.11	0.97	4.2
		Cont.	—	40		4.88	1.10	4.1
		race 1 (S)	100	40		5.52	0.93	5.8

Remarks: These figures are mean of duplicated measurements.

1) μl/100 mg. f. wt./15 min.

Within seven hours after inoculation, no significant difference was observed between $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ of the slices infected by compatible and by incompatible races. Thereafter, cells of slices infected by the incompatible race began to

degenerate. Twenty-four hours after inoculation, the $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ of the slices which turned brown because of a hypersensitive reaction to infection by an incompatible race was distinctly high. $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ of susceptible slices invaded by the parasite remained at the same level as that of the control until at least twenty hours after inoculation, but forty hours after inoculation, when the infected slices began to degenerate, an increase over that of the control was observed.

Within seven hours after inoculation, no significant difference was found in R. Q. values between the slices infected by the compatible race and uninfected ones, but in a later stage the R. Q. of the infected slices was a little lower than that of the not infected slices.

3. Changes in respiration of the potato tuber tissue neighbouring the infected cells

a) On the exponential respiratory curve found in the tissue neighbouring the cut surface (uninfected)

In the previous paper (TOMIYAMA, TAKAKUWA and TAKASE 1958), it was shown that in uninfected tuber tissue the respiration curve plotted from cut surface toward the interior of potato tuber tissue was negatively exponential. It is difficult to decide whether the curve obtained coincides exactly with an exponential curve or not, because of the errors inherent in any biological experiments. It seems certain, however, that the respiratory stimulation in tissue neighbouring the lesion has a tendency to follow an exponential curve. An attempt was therefore made to explain this phenomenon.

If a decreasing rate of respiration at a point a certain distance from the cut surface of a potato tuber is assumed to be proportional to the intensity of respiration at that point, the following equation may be formulated:

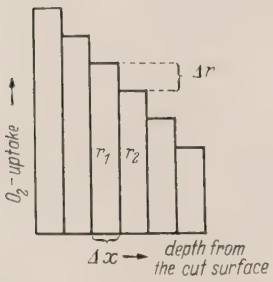


Fig. 7. Schematic explanation of respiratory inclination curve in the tissue near the cut surface of potato tuber

$$\text{(eq. 1)} \qquad \frac{\Delta r}{\Delta x} = -kr$$

where Δr is the increment of decrease in respiration, and Δx is a finite interval taken in the distance from the cut surface to the interior of the tuber tissue (see Fig. 7). By integrating equation 1, the following equation will be given:

$$\text{(eq. 2)} \qquad r = r_o e^{-kx}$$

where r_o is the additional respiration in the cells of the superficial layer of cut tuber tissue over a basal level. The goodness of fit of equation (2) to the experimental results was shown in the

previous paper (TOMIYAMA, TAKAKUWA and TAKASE 1958), giving support to the relationship expressed in equation (1).

If the thickness of a cell is taken as a unit of distance, Δx becomes unity and equation (1) may be rewritten as follows:

(eq. 3) $$\Delta r = -kr$$

If Δr is the difference in respiration between two adjacent cells, one has

(eq. 4) $$r_r - r_{r+1} = -k\frac{r_r + r_{r+1}}{2}$$

and dividing it by r_r:

(eq. 5) $$\frac{r_{r+1}}{r_r} = \frac{1 + \frac{k}{2}}{1 - \frac{k}{2}} = K$$

where r_r and r_{r+1} are, respectively, values of respiration of adjacent cells progressing inwardly from the cut surface. This then can represent the difference between the total respiration of a stimulated cell and that of a control (unstimulated) cell.

As the calculated value coincides well with the experimental value, it may be reasonable to assume that the ratio of the respiration rate of a cell located some distance from the cut surface, to that of the next cell is essentially constant.

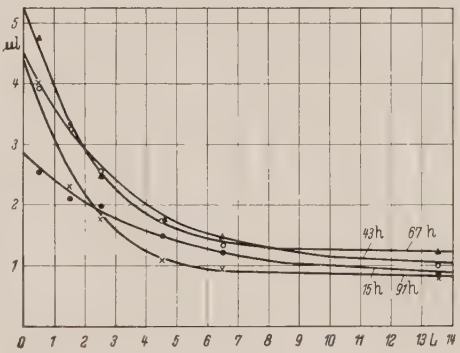


Fig. 8. Hourly changes of exponential respiratory curve obtained in the tuber tissue from cut surface to the interior in the variety (Norin No. 1). The curves were calculated according to the equation $r = r_0 e^{-kx}$. The spots show the experimental data. Abscissa: Distance from cut surface, expressed as L (a unit which is equivalent to the thickness of a slice). Ordinate: Respiratory activity expressed as μl per 100 mg. fresh weight and 15 min. The times shown in figure are those after cutting the tuber

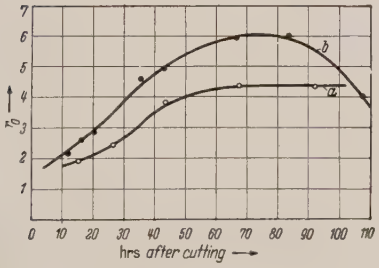


Fig. 9. Hourly changes of v_0 values, showing the respiratory rate of the first cell layer of cut surface tissue of tuber (Norin No. 1). The curves were calculated according to equation (4). The spots show the experimental data. a: experiments in November; b: in April

The above described exponential respiratory curve in the tissue neighbouring the injured cells changes with time as shown in Figure 8. Hourly changes of K and r_o values calculated from each experiment are shown in Figures 9 and 10. If one assumes that the time rate of increase in r_o value is controlled by a monomolecular autocatalytic reaction, the following equation may be formulated:

(eq. 6) $$\frac{dr_o}{dt} = mr_o(R_o - r_o)$$

where R_o is the maximum amount of O_2-uptake to which the r_o value reaches in course of time and m is a constant. By integration, the following equation will be given:

(eq. 7) $$\ln \frac{r_o}{R_o - r_o} = m(t - \tau)$$

(eq. 8) $$r_o = \frac{R_o e^{m(t-\tau)}}{1 + e^{m(t-\tau)}}$$

where τ is the time elapsed from cutting until the r_o value reaches one-half of R_o. The goodness of fit to the experimental values shown in Figure 9 may suggest that the respiratory increase in superficial cells of cut tuber is controlled by a monomolecular autocatalytic reaction. No definite tendency was recognized in the drift of k values, but it appears to have some relationships to the drift of τ_o values (Fig. 10). About 90 to 100 hours after cutting, the stimulated respiration began to decrease as shown in Figure 8.

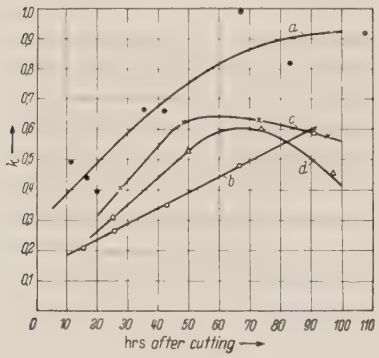


Fig. 10. Hourly changes of k-values in equation (2). The curves are not calculated ones, but only imaginative. a: Norin No. 1 in April; b: Norin No. 1 in November; c and d: Hokkai No. 10

b) Terminal oxidase in tissue neighbouring the cut surface of uninfected potato tuber

In order to elucidate the terminal oxidase activity involved in the above described course of respiratory stimulation in tissue neighbouring the cut surface of uninfected potato tuber, the influence of several oxidative enzyme inhibitors upon the respiration of the slices from the tuber tissue was examined.

As shown in Figures 11 and 14, the respiratory curve found in the tissue from the cut surface towards the interior was not exponential at reduced oxygen concentration (95 % N_2 + 5 % O_2). It was demonstrated by

preliminary experiments that the reduction of the stimulated oxygen uptake at reduced oxygen concentration is not due to a shortage of oxygen. Therefore it appears that the greater proportion of the increment of O_2-uptake due to the action of injury is mediated by a terminal oxidase having lower affinity for oxygen.

O_2-uptake of slices in air was often influenced by light. This phenomenon, the cause of which is yet unknown, is likely to lead one to a false interpretation of results obtained from CO-inhibition experiments. About one hour after cutting, the respiration of all the tissue in the range from the cut surface to the interior showed almost the same extent of light-reversible CO-sensitivity. At more than five hours after cutting, however, in the tissue of the cut surface (the first slice of the tissue) the CO-sensitivity decreased and finally disappeared, whereas in the inner tissue it tended to increase.

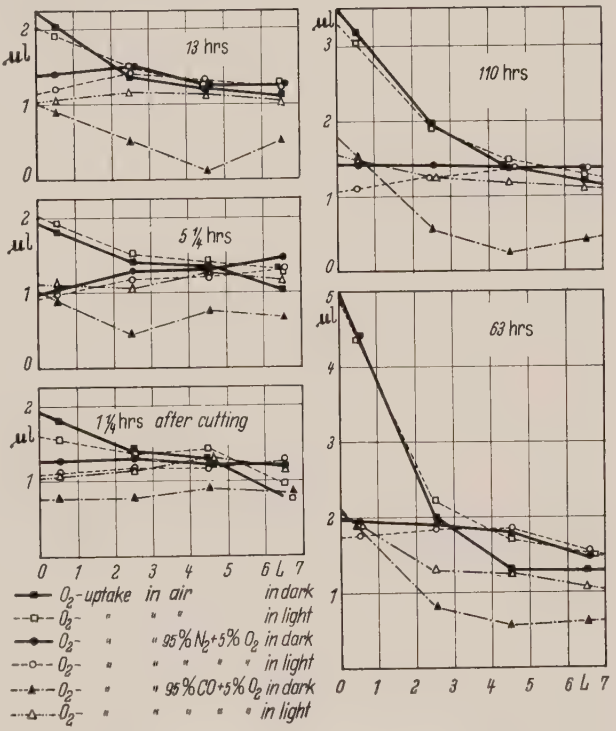


Fig. 11. Effect of CO on the respiration of potato tuber tissue neighbouring the cut surface. Abscissa and ordinate are the same as in Fig. 6

Fig. 13 shows that three or four cells distant from the cut surface there is a tissue zone where the respiration is resistant to cyanide inhibition. Although such a zone is not observed in a control (cut and uninfected) in Fig. 12, it appears that a determination of O_2-uptake in this particular zone was skipped in this case. Existence of this zone of resistance to cyanide inhibition suggests that the cyanide-sensitive oxidase in a layer of a few cells of cut surface tissue is different from that of inner tissue. The cyanide-sensitive oxidase of inner tissue may be identical with the oxidase sensitive to carbon monoxide. The fact that the cyanide-sensitive oxidase in the tissue near the cut surface (the tissue of 1 L) seems to be insensitive to carbon monoxide suggests that it may possibly be ascorbic oxidase. The stimulated respiration seems to be depressed remarkably at a reduced oxygen concentration. THIMANN, YOKUM and HACKWETT (1954) showed that the affinity of ascorbic oxidase for

oxygen is very low. The presumption discussed above, however, must be examined carefully.

As shown in Figs. 11, 14 and 15, the CO-inhibition was not reversed completely by illumination. This evidence is considered to indicate that polyphenol oxidase also functions as a terminal oxidase.

The curves of malonate sensitive respiration are more or less similar to those of total (uninhibited) O_2-uptake, and have not such an insensitive zone as in the case of the cyanide-sensitive respiratory curve. This seems to suggest that the O_2-uptake increased by injury upon cutting proceeds partially through the TCA cycle.

The comparison of CO_2-output under air and nitrogen was shown in Fig. 16, in which the dotted line represents one-third of CO_2-output under

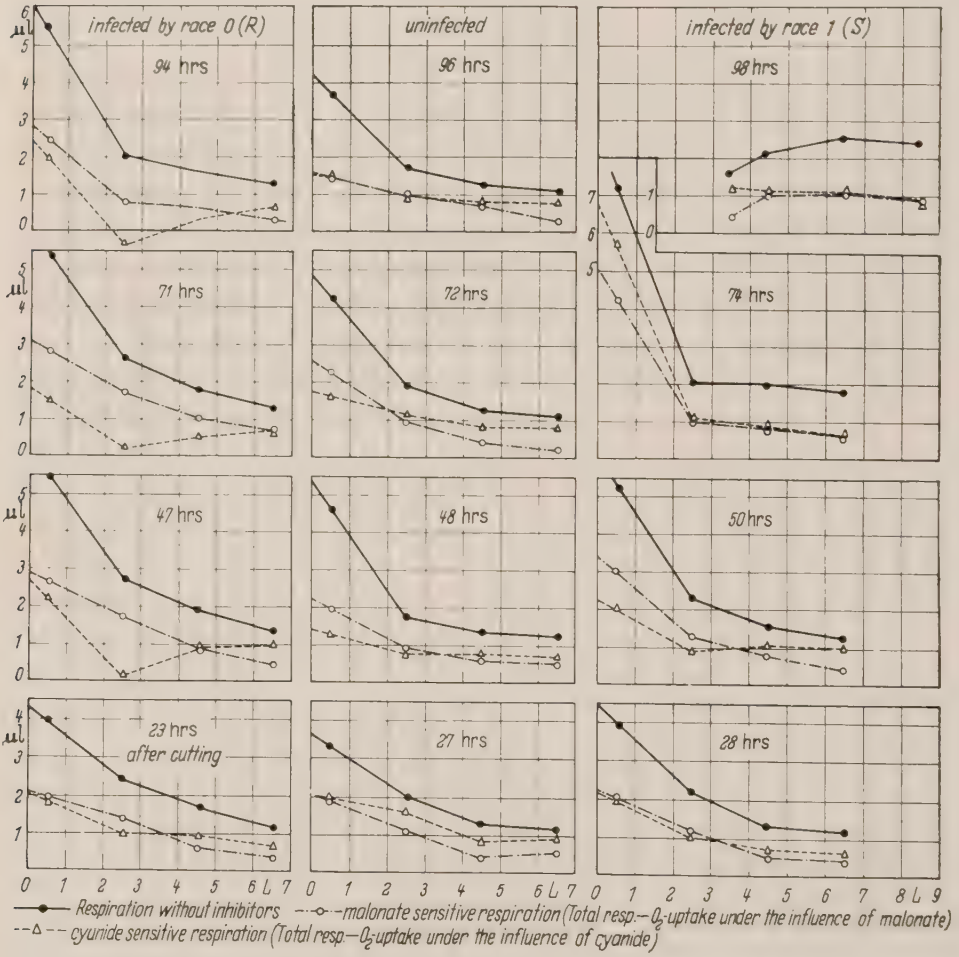


Fig. 12. Effect of Cyanide and malonate on the respiration of potato tuber tissue neighbouring the cells infected by *Phytophthora infestans*

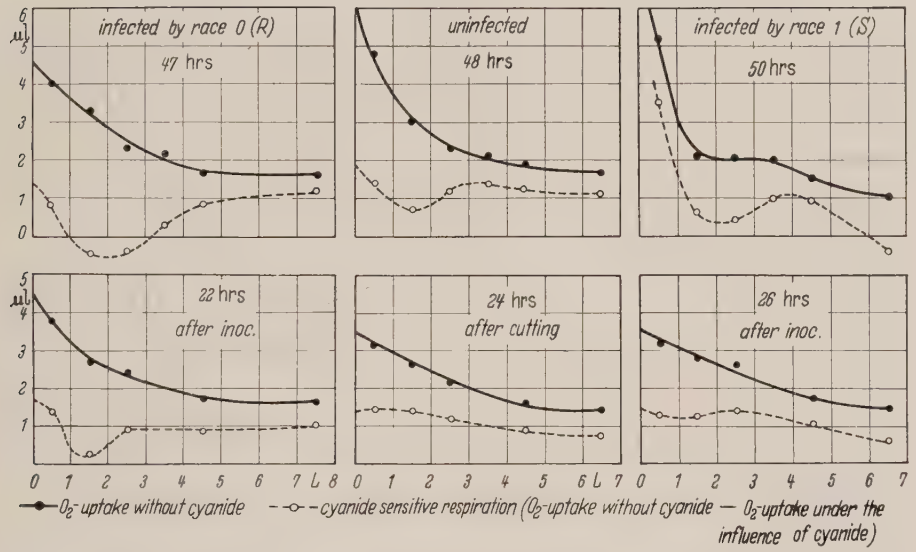


Fig. 13. Effect of cyanide on the respiration of potato tuber tissue neighbouring the cut surface infected by *Phytophthora infestans*

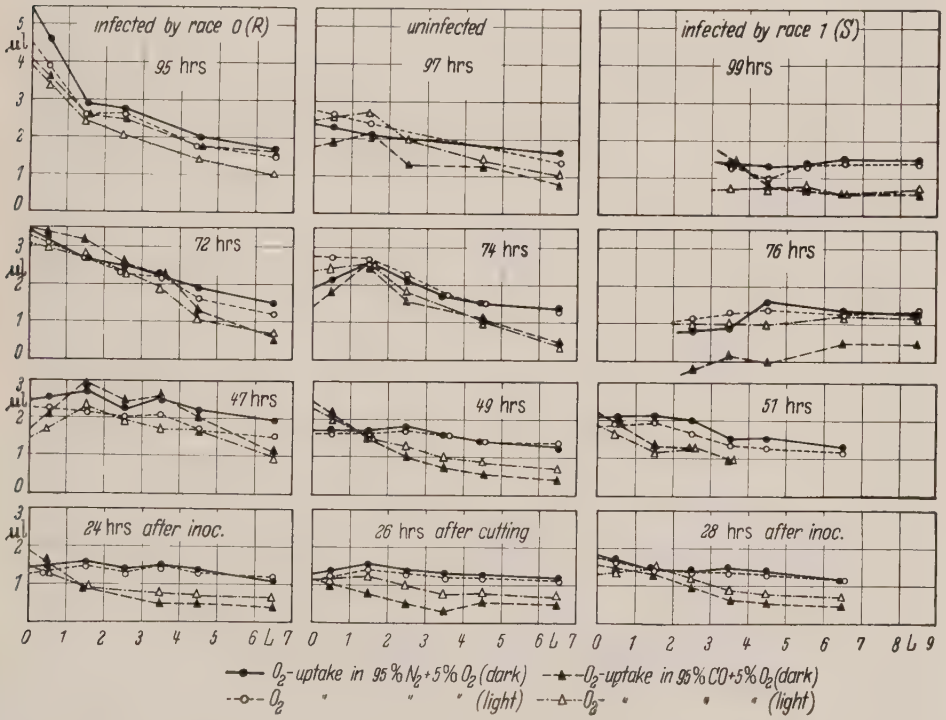


Fig. 14. Effect of carbon monoxide on the O_2-uptake of potato tuber tissue neighbouring the cut surface tissue infected by *Phytophthora infestans*

air. This figure shows that $Q_{CO_2}^{N_2} / Q_{CO_2}^{air}$ is smaller than 1/3 in a layer consisting of a few cells of cut surface, but greater than 1/3 in the next tissue zone, and nearly equal to 1/3 in the inner tissue.

c) Terminal oxidase in tissue neighbouring the cut surface cells inoculated with *Phytophthora infestans*

The purpose of the experiments described in this section is to learn how the nature of respiration of tissue neighbouring the cut surface is modified through infection by compatible and incompatible races of *Phytophthora infestans*.

Figs. 12, 13, 15 and 16 show that in the initial period of infection the curves of total O_2-uptake from the cut surface to the interior are also exponential in both tissues infected by compatible or by incompatible races. About fifty or seventy hours after infection, however, the curves of O_2-uptake of the tissue infected by a compatible race lost the tendency to be exponential and the respiration in the superficial tissue was significantly high. This high respiration is attributable to the formation of conidiophores on the cut surface.

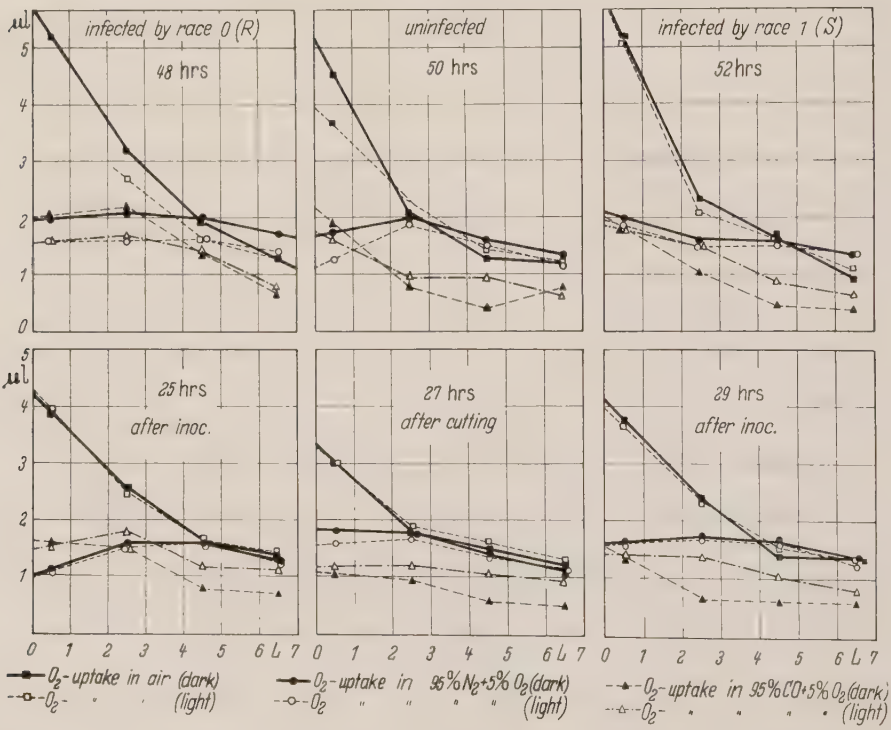


Fig. 15. Effect of carbon monoxide an the respiration of potato tuber tissue neighbouring the cut surface tissue infected by *P. infestans*

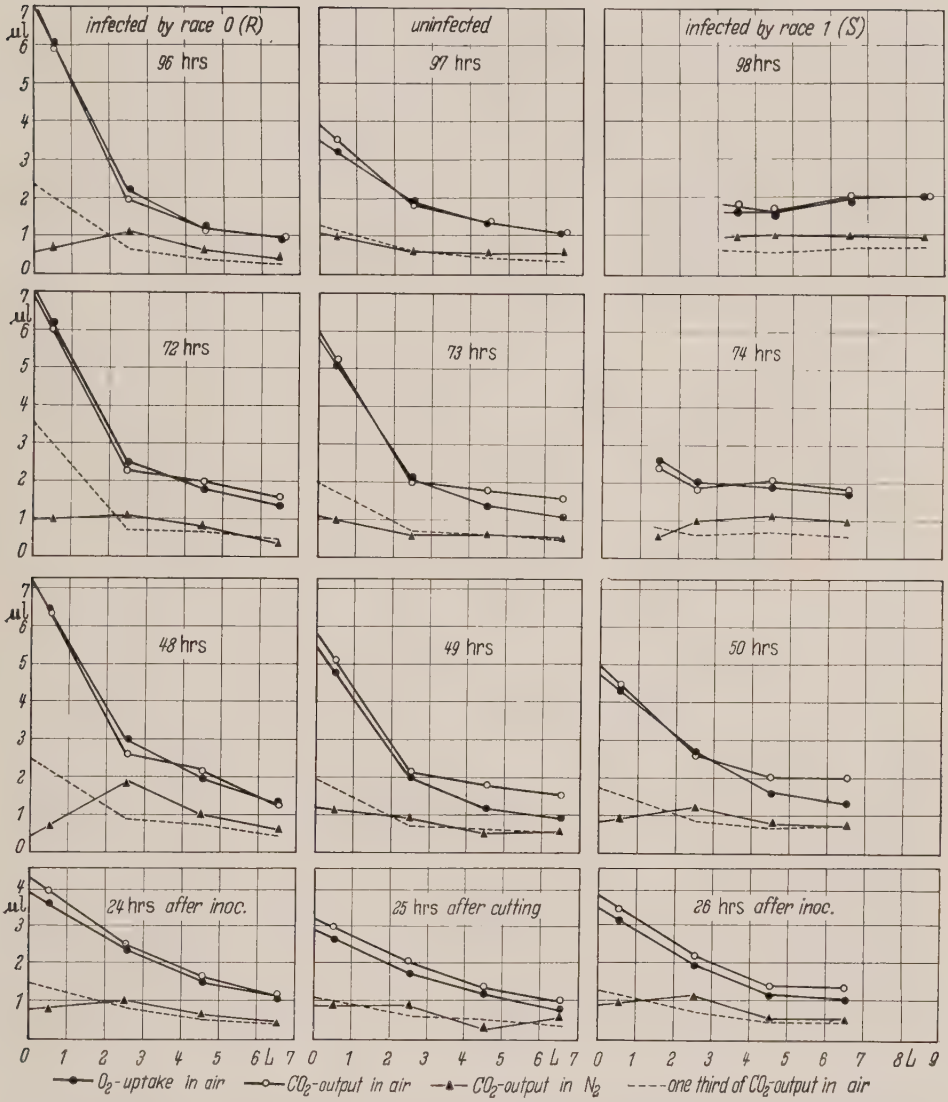


Fig. 16. Comparison between aerobic and anaerobic CO_2-output of the tissue neighbouring the cut surface tissue infected by *P. infestans* (μl/100 mg. fr. wt./15 min.)

Figs. 12 and 13 show that the cyanide-sensitive zone described in the previous section is larger in the tissue exhibiting resistance to the pathogen than in either the uninfected or the susceptible tissue. The percentage inhibition by cyanide is generally higher in the inner tissue than in the tissue near the cut surface in both the cases of uninfected and of incompatible race-infected tissues. But in a later period of infection, on the other hand, percentage inhibition was somewhat lower in the inner tissue than in the outer tissue, when the tissue was infected by a compatible race. This pheno-

menon may also arise from the formation of conidiophores on the cut surface and from the diseased condition of the inner tissue.

It is interesting that the percentage inhibition by malonate is generally smaller than that produced by cyanide in the inner tissue, but in the later stage of infection by a compatible race of *P. infestans*, it is almost the same as that produced by cyanide in the inner tissue.

Figs. 14 and 15 show that the CO-insensitivity of O_2-uptake in cut surface tissue is more distinct in the tissue exhibiting resistance to the pathogen than in susceptible and uninfected ones. Such a tendency was also recognized in the cyanide sensitivity.

The changes of $Q_{CO_2}^{N_2} / Q_{CO_2}^{air}$ in the tissue neighbouring the cut surface, described in the previous section, are distinctly greater in the superficial tissue infected by an incompatible race. It is noteworthy that even in a later period of infection by a compatible race, the $Q_{CO_2}^{N_2} / Q_{CO_2}^{air}$ is greater than the 1/3 expected as a theoretical minimum.

4. The influence of metabolic products of *Phytophthora infestans* on the Pasteur effect in potato tuber slices

Some of the results obtained are shown in Figs. 17 and 18. The respiratory rate is higher in both slices treated with the uncultured medium and with the culture filtrate than in those treated with tap water. R.Q.s and $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ values were higher, however, in the slices treated with uncultured medium than in those of the other two groups. There seems to be no significant difference between the slices treated with culture filtrate and those treated with tap water. Variation in the length of periods of culture in these experiments seems to have no influence on the effect of the filtrate on the respiration of slices.

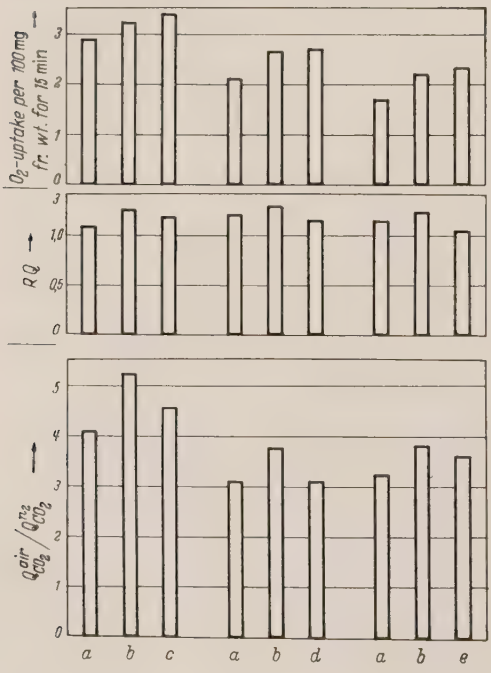


Fig. 17. Effect of cultural filtrate of *Phytophthora infestans* on the respiration of potato tuber slices (About one hour after treatment).

a) Treated with water.
b) Treated with uncultured potato-glucose media.
c) Treated with cultural filtrate of race 0.
d) Treated with cultural filtrate of race 1.
e) Treated with uncultured media which were oxidized beforehand by small amount of juice from potato tuber.

The fact that the colour of slices treated with the uncultured medium turned pale reddish brown, would suggest that the quinone derived from polyphenols may play a role in lowering $Q_{CO_2}^{N_2} / Q_{CO_2}^{air}$ of the slices. This presumption is plausible, because being oxidized before application the uncultured medium lost its effect. As shown in Fig. 16, the treatment of slices with culture filtrate exerts no influence on $Q_{CO_2}^{N_2} / Q_{CO_2}^{air}$ twenty hours after treatment. These facts seem to show that the metabolic products of both compatible and incompatible races of *P. infestans* have no effect on the respiration of potato tuber tissue. Rubin and Aksenova (1957) also showed that fungal extracts and cultured filtrate of *Phytophthora infestans* have no influence on the activity of isolated and purified enzyme preparations.

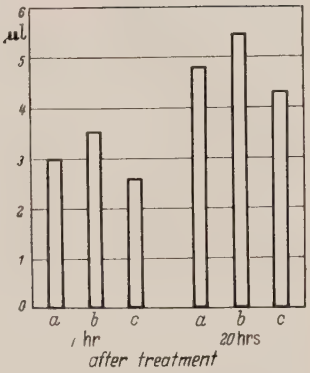


Fig. 18. Hourly changes of O_2-uptake of the slices treated with cultural filtrate of *Phytophthora infestans* in process of time. The signs, a, b and c are the same as those in Fig. 16

III. DISCUSSION

1. Respiratory changes in a cell invaded by the parasite

In these considerations, a cell invaded by an incompatible race of the parasite will be called "resistant host-parasite complex" (r. h-p complex), and one invaded by a compatible race "susceptible host-parasite complex" (s. h-p complex).

Upon reviewing the results described in section II, it appears that the respiratory rate of the slices, almost all the cells of which were infected by an incompatible race of *Phytophthora infestans,* is about 10 to 12 per cent higher than that of the slices infected by a compatible race in an early stage of the infection before dead cells were observed. As described in section I, no definite difference was observed in respiratory rate between H_{101} (race 0) and H_{103} (race 1). Accordingly it may be reasonable to state that the respiration in a r. h-p complex is more stimulated than that in a s. h-p complex in the initial period of the infection.

Such a stimulation of respiration in a r. h-p complex may reasonably be attributed to a reaction of the host cell to the infection by the parasite, because the amount of living protoplasm of the parasite may be negligible compared with that of the host cells, at least in such an early period of the infection. It is assumed that such a stimulation in the respiration is caused by the harmful effect of the infection by an incompatible parasite in the cytoplasm of the host plant. It is therefore reasonable to suppose that the respiration of the invading parasite is also stimulated when the host cell is resisting it. In this respect one should avoid attributing the cause of stimulation in a r. h-p. complex only to the reaction by a host cell.

In a s. h-p. complex an increase in the respiratory rate was also found in an initial period of the infection, although the rate of increase is lower than that of the respiratory rate in a r. h-p. complex. In a later stage no distinct difference was found between the s. h.-p. complex and the uninfected cells. It may well be supposed that in an initial period of the infection, the s. h.-p. complex is rather unstable in view of the physiological condition.

The results obtained from the inhibition experiments with KCN seem to indicate that in the later stage when the invaded cells begin to degenerate, the activity of metallo-enzyme decreased remarkably, and is replaced by a cyanide-resistant respiration. In a eusymbiotic stage, the metallo-enzyme activity in a s. h.-p. complex is not different from that in an uninfected slice. Shortly afterwards, when the s. h.-p. complex begins to degenerate, the metallo-enzyme activity seems to be replaced by a cyanide-resistant enzyme system. These results seem to show that a lowering of metallo-enzyme activity parallels the degeneration process in either r. h.-p. complex or s. h.-p. complex. In accordance with this phenomenon, in either r. h.-p. or s. h.-p. complex, $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ increases in the final stage when the invaded cells begin to degenerate. In the experiments described in another report (TAKAKUWA, TOMIYAMA and KATO [unpublished]), it was found that $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ of uninfected slices increases in about one day after slicing. The relatively higher values of $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ in uninfected slices in these experiments may be due to the above described phenomenon.

2. Respiratory changes in the tissue neighbouring the infected cells

In the superficial cells of the cut tuber, the rate of O_2-uptake seems to increase following the equation of monomolecular autocatalytic reaction. The rate of O_2-uptake decreases exponentially from the cut surface to the interior. This phenomenon suggests that the respiratory increase is controlled by a monomolecular autocatalytic reaction, and the ratio of the O_2-uptake of a cell somewhat distant from the cut surface to that of the next cell is essentially constant at a given time after cutting. About ninety hours after cutting, the O_2-uptake which has so far increased, begins to decrease. Although there is no decisive evidence to allow a decision whether the exponential respiratory curve described above is caused by the variation of oxygen tension from the cut surface to the interior or is only a result of the cutting act, the present writers are inclined to regard it as a general physiological reaction of the tissues to the injury. This contention is supported by the evidence described in the previous report (TOMIYAMA et al. 1958).

According to inhibition experiments with specific inhibitors, a part of the stimulated respiration in the tissue near the cut surface is suspected to be mediated by ascorbic oxidase. However, the final conclusion should be withheld until further evidence of real existence of ascorbic acid oxidase in this tissue is obtained. The oxidative system in which TPNH is oxidized by gluthathione and dehydroascorbic acid is well known (BONNER 1957, JAMES 1953 and MAPSON 1958). BARKER and MAPSON (cited

by Mapson 1958) demonstrated the presence of the GSH-ascorbic acid enzyme system in potato tuber. Beever (1954) described the relationship between the ascorbic acid oxidizing system and the pentose phosphate pathway. Active operation of the pentose phosphate pathway in the infected tissue was suspected by Uritani (1954, 1959) and Suzuki (1957) in sweet potato infected by *Ceratostomella fimbriata* and by *Helicobasidium monpa;* by Tamari (1957) in rice blast disease and by Shaw and Samborski (1957) in rusted and mildewed cereal leaves. Daly et al. (1957 a, b) showed in their experiment on rusted safflower that the hexose monophosphate shunt plays the role of the major respiratory pathway during sporulation. Király and Farkas (1957) showed that iron catalysis found in healthy wheat tissue will be replaced in a very short time by copper catalysis when rust infection sets in. It is quite possible, however, that their oxidative pathway in diseased tissue is different from ours because they showed that the pathway is highly resistant to malonate. Suzuki (1957) reported that in the sweet potato tissue infected by *Helicobasidium monpa,* catechol oxidase functions as the main terminal oxidase in the locus near the necrosis, behind which cytochrome oxidase is stimulated while the tissue defends itself actively. Although real existence of ascorbic acid oxidase in the tissues of the present experiments still is not clear, it seems plausible to the authors that the cyanide sensitive component of the oxidative system in the superficial layer of cut potato tuber is different from that of the inner tissue.

It seems reasonable to suppose that cyanide- and CO-intensivite terminal oxidase, the leading oxidase operating in the tissue zone a few cells distant from the cut surface, is also acting together with above described oxidase in the tissue near the cut surface. This enzyme seems related to the terminal oxidase system resistant to cyanide and to carbon monoxide and having a high affinity for oxygen, on which Thimann, Yocum and Hackett (1954) reported. It is interesting that the cyanide-resistant respiration of the *Aroid spadix* is supposed to be mediated by the system involving cytochrome b (Hackett 1957).

In parallel with the respiratory changes described above, the morphological changes must be considered. Many reports have been published on wound healing of potato tuber (reviewed by Koba 1958 a). Koba (1958 b) showed that about 12 to 16 hours at 30 °C. after wounding, the exposed cell wall of the superficial living cells of the cut surface tissue responded to staining by Sudan III; about 20 to 28 hours after wounding these tissues responded to staining by phloroglucin-HCl reagent. Thereafter the decrease or disappearance of starches was observed in 1 to 3 cell layers of cut surface tissue, and the exposed cell walls of the superficial living cells of the cut surface could be stained by Sudan III significantly. These conditions were recognizable for at least five days at 20 °C after wounding.

Ten days at 20 °C after wounding, the entire walls of the cells belonging to the superficial cell layer were found to respond to staining by Sudan III, and the first sign of meristematic activity was observed in the second cell

layer. In KOBA's experiments, it required about thirty-five days to complete the wound cork formation.

As the present experiments were carried out at 19 °C within about six days, it appears that meristematic activity had not yet taken place. The cells which would be expected to show meristematic activity later may be contained in the first slices in the present experiments. Therefore it may reasonably be supposed that the variation of respiratory activity from the cut surface to the interior is related to the metabolism producing the substrates necessary for the meristematic activity. It is interesting that the meristematic activity seems to take place initially only after the respiratory activity has reached its maximum. These processes, however, should be followed more precisely in the future.

In experiments in which both the compatible and incompatible races were inoculated on the cut surface of tubers, it was shown that the respiratory reaction of tubers to infection by the incompatible race was almost qualitatively identical with that of uninfected cut tubers. However, this observed reaction occurred much earlier and more severely in tubers infected with the incompatible race than in the uninfected ones. Therefore the respiratory changes in the tissue resisting the infection of the parasite will involve partly the same process as in the respiratory response to cutting injury. URITANI et al. (1959) showed that ipomeamaron seems to be produced only in the case of necrobiosis (abnormal living cell). They could not find it in the cut tissue of sweet potato. Although such substances as ipomeamaron have not yet been found in the white potato tuber, work will have to be done to clarify the relation between the production of abnormal metabolites in diseased cells and the changes of terminal oxidases in the cells resistant to the pathogens. In the case of the tubers infected by the compatible race, contrarywise, the velocity and intensity of reaction are about the same as in the uninfected ones at least in the initial period of infection. Accordingly, it is presumed that when a tuber is susceptible, the infection by *P. infestans* does not cause any change in the respiration of the host tuber cells in the early stages of infection. In a later stage of infection, however, some difference was observed in the degree of respiratory inhibition by inhibitors between the tissues infected by compatible race and the uninfected tissues, but no difference in the ratio $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$. As described above, the slices, which were thoroughly infected by the compatible race, have $Q_{CO_2}^{air} / Q_{CO_2}^{N_2}$ values similar to those of uninfected slices. Since ALLEN (1953) put forward the idea that the increased respiration in the diseased tissues may be partly ascribed to the toxins acting as an uncoupler, many investigations of this aspect (URITANI et al. 1954, YARWOOD 1953, MILLERD and SCOTT 1956, SUZUKI et al. 1957 etc.) have been published. DALY and SAYRE (1957 a), however, showed in their precise experiments on safflower infected by *Puccinia carthami* that during mycelial growth of the parasite the ratio of anaerobic to aerobic CO_2 production was above the expected value of $^1/_3$, and that with the onset of sporulation the ratio fell to values below those anticipated. They found

that an increase in respiration was correlated with an increase in length and weight of the invaded tissues. Accordingly they stated: "increased host growth as a consequence of infection appears to eliminate uncoupling toxins as the factors in increasing respiratory activity". Results obtained in the present experiments show clearly that the inhibition of the PASTEUR effect is not necessarily an indispensable premise for susceptibility in the case of symbiotic host-parasite relation. These results seem to favour the finding in the writers' earlier reports (TOMIYAMA et al. 1955, 1956, 1957, 1958) that in tissues resistant to *Phytophthora infestans* the infection by an incompatible race gives rise to synthesis, but no significant difference in soluble protein content was observed between the same tissues when infected by a compatible race and when uninfected. In the case of facultative parasites, whether the PASTEUR effect operates effeciently in a host plant or not will be an important factor to decide the fate of an invading parasite (URITANI 1954, SUZUKI and TOYODA 1957). In the case of potato late blight, it was also found that the resistance of potato tuber tissue to an incompatible race of *Phytophthora infestans* is not complete when the $Q_{CO_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ value was increased (TAKAKUWA et al., unpublished [24]). GRÜMMER (1955) showed that potato plants containing a smaller amount of protein are relatively more susceptible to *Phytophthora infestans*. These findings may lead one to conclude that efficiency of the PASTEUR effect is related to a defense reaction and not to a eusymbiotic relationship. This phenomenon seems in accord with the observation that the metabolic products of both compatible and incompatible races of *Phytophthora infestans* appear to have no influence on the PASTEUR effect in potato tuber tissue. It should be criticized, however, whether or not the $Q_{O_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ values indicate the efficiency of the PASTEUR effect. BARRON et al. (1950) showed that the end products of fermentation in the potato tuber slice were alcohol and lactic acid which were formed in a ratio of 17 : 1. Therefore, the $Q_{CO_2}^{air}/Q_{CO_2}^{N_2}$ values in the present experiments may be looked upon as an expression of efficiency of the PASTEUR effect. Analytical experiments, however, should be done in the future in order to draw a definite conclusion concerning the efficiency of the PASTEUR effect in these host-parasite relationships.

The accelerated respiration described above is thought to be related to: 1) the defense mechanism of the potato plant against *Phytophthora infestans* especially to that of hyper-sensitive death of the infected cells (TOMIYAMA 1957, a, c), 2) the production of antibiotic principles, such as phytoalexin which was demonstrated by MÜLLER (1956, 1958) in *Phaseolus vulgaris* and was supposed to play an important role in the defense reaction to blight in potatoes, 3) the process of repairing of lesions including sealing of the fungus into the infected lesion (TOMIYAMA 1955 and 1957 a) the accumulation of Scopolin, aglykon Scopoletin (FUCHS 1956) and other substances. No experimental explanation, however, has been given so far as to how the accelerated respiration is related to these phenomena.

The authors wish to express their appreciation to Prof. Y. TOCHINAI, Dr. I. TANAKA, Prof. T. TAGAWA and Dr. Y. NISHIYAMA for their advice and encouragement during these investigations, and to Prof. M. A. STOHMANN and Prof. I. URITANI for their advice on the preparation of the manuscript.

Summary

1. In order to clarify the respiratory change involved in the process of resistance of a potato plant to *Phytophthora infestans*, experiments were carried out on the respiration of both the cells invaded by the parasite and the neighbouring tissue.

2. The respiration of race 0 and of race 1 of the fungus used in the present experiments were compared.

3. The respiratory change in slices thoroughly invaded by the parasite was studied to learn the changes which take place in an invaded cell.

4. In an initial period of infection, the respiration was more stimulated in cells invaded by an incompatible race of *Phytophthora infestans* than in those invaded by a compatible race. In a later stage of infection, when the cells began to degenerate, the respiration became CO- and cyanide-resistant in both the susceptible and resistant cells.

5. The respiratory stimulation in superficial cell layers of the cut surface of tuber caused by the act of cutting seems to be controlled by a monomolecular autocatalytic reaction.

6. It was shown by theoretical considerations that the ratio of the O_2-uptake of a cell somewhat distant from the cut surface to that of the next cell is essentially constant at a given time after cutting.

7. Ascorbic acid oxidase is suspected to play a role as a terminal oxidase in the stimulated respiration caused by the act of cutting. It is also presumed that the CO- and cyanide-sensitive enzyme system which seems to have a high affinity for oxygen plays the role of terminal oxidase in the tissue. Cytochrome oxidase was also found to be stimulated in inner tissues.

8. In respect to their causation by inoculation of the cut surface of potato tuber with dense zoospore suspensions of *Phytophthora infestans*, the respiratory changes in the tissue neighbouring the infected cells were studied.

9. The respiratory change in tuber tissue resisting infection by the parasite was suspected to involve partly the same process as in the respiratory response to the act of cutting. The influence of infection by an incompatible race, however, is more severe and deeper than that of cutting. No significant difference was found in respiratory changes between the tissues invaded by a compatible race and uninfected tissues at least in the relatively early stages of the disease.

10. There was no influence upon the PASTEUR effect in tissues invaded by a compatible race until a later stage. The influence was first observed

when the infected cells began to degenerate. It was presumed that the efficiency of the PASTEUR effect is related to a defense reaction, and not to a eusymbiotic relationship, especially in the case of potato late blight.

11. The culture filtrates of both race 0 and race 1 did not alter the PASTEUR effect in the slices of potato tuber resistant to the former and susceptible to the latter.

Zusammenfassung

1. Um die Veränderung der Atmung zu erklären, welche in Kartoffeln während der Abwehr einer Infektion mit *Phytophthora infestans* beobachtet werden kann, wurden Untersuchungen über die Atmung infizierter Zellen und ihres Nachbargewebes durchgeführt.

2. Die Atmung der in diesen Versuchen verwendeten Pilzstämme 0 und 1 wurde verglichen.

3. Um die Atmung einer einzelnen infizierten Zelle kennenzulernen, wurde die Atmung gründlich durchinfizierter Knollenschnitte untersucht.

4. Während der ersten Phase der Infektion wurde die Atmung in jenen Zellen mehr gefördert, welche mit einem virulenten Stamm von *Phytophthora infestans* infiziert worden waren, als in jenen mit einem avirulenten Stamm. In einer späteren Phase der Infektion — die Zellen begannen bereits zu degenerieren — wurde die Atmung sowohl der resistenten wie auch der empfindlichen Zellen von Kohlenmonoxyd und Cyanid unabhängig.

5. Die Atmungsförderung, welche in einer oberflächlichen Zellschicht durch den Schnitt hervorgerufen wird, scheint von einer monomolekularen, autokatalytischen Reaktion abzuhängen.

6. Theoretische Überlegungen führten zum Schluß, daß das Verhältnis der Sauerstoffaufnahme einer der Schnittfläche nicht zu nahe gelegenen Zelle zu derjenigen ihrer Nachbarzelle zu einer bestimmten Zeit nach dem Schneiden im wesentlichen konstant ist.

7. Es wird vermutet, daß in der durch den Schnitt verursachten Stimulation der Atmung die Ascorbinsäureoxydase eine Rolle als terminale Oxydase spielt. Es kann auch angenommen werden, daß das Kohlenmonoxyd- und Cyanid-abhängige Enzymsystem, welches eine starke Affinität zum Sauerstoff zu besitzen scheint, im Gewebe als terminale Oxydase wirkt. Zudem wurde festgestellt, daß die Cytochromoxydase in den inneren Geweben stimuliert.

8. Die Atmungsveränderungen derjenigen Gewebe, welche neben infizierten Zellen liegen, wurden in Abhängigkeit der Infektion der Knollenschnittflächen mit dichten Zoosporensuspensionen von *Phytophthora infestans* untersucht.

9. Es wird vermutet, daß die Atmungsveränderung von Knollengewebe, welches dem eindringenden Parasiten Widerstand leistet, zum Teil auf den gleichen Ursachen beruht wie die Atmungsveränderung, welche beim An-

schnitt der Knolle eintritt. Mindestens während relativ früher Stadien der Erkrankung wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen der Atmungsveränderung in nicht infizierten Geweben und solchen, welche mit einem avirulenten Stamm infiziert worden waren, gefunden.

10. In Geweben, welche mit einem avirulenten Stamm infiziert worden waren, wurde der PASTEUR-Effekt erst während eines späten Stadiums beeinflußt, nämlich erst dann, als die infizierten Zellen zu degenerieren anfingen. Es wurde angenommen, daß besonders bei der Kartoffelfäule die Funktionstüchtigkeit des PASTEUR-Effekts mit einer Abwehrreaktion und nicht mit einer eusymbiotischen Reaktion zusammenhängt.

11. Kulturfiltrate der Stämme 0 und 1 vermochten den PASTEUR-Effekt von Kartoffelknollenschnitten nicht zu verändern, obwohl der lebende Pilz vom Stamm 1 eine Veränderung hervorzurufen vermag.

Literature Cited

1. ALLEN, P. J., 1953: Toxins and tissue respiration. Phytopathology **43**, 221—229.
2. BARRON, E. S. G., G. K. K. LINK, R. M. KLEIN and B. E. MICHEL, 1950: The metabolism of potato slices. Arch. Biochem. **28**, 377—397.
3. BEEVERS, H., 1954: The oxidation of reduced diphospho-pyridine nucleotide by an ascorbic system from cucumber. Plant. physiol. **29**, 265—269.
4. BONNER, W. D., 1957: Soluble oxidases and their functions. Ann. Rev. Plant. physiol. **8**, 427—452.
5. DALY, J. M., and R. M. SAYRE, 1957 a: Relations between growth and respiratory metabolism in safflower infected by *Puccinia carthami*. Phytopathology **47**, 163—168.
6. — —, and J. H. PAZUR, 1957 b: The hexose monophosphate shunt as the major respiratory pathway during sporulation of rust of safflower. Plant physiol. **32**, 44—48.
7. FARKAS, G. L., and Z. KIRÁLY, 1958: Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes. Phytopath. Z. **31**, 251—272.
8. FUCHS, W. H., 1956: Ein Beitrag zur pathologischen Physiologie. Angew. Bot. **30**, 141—146.
9. GRÜMMER, G., 1955: Die Beziehungen zwischen dem Eiweißstoffwechsel von Kulturpflanzen und ihrer Anfälligkeit gegen parasitische Pilze. Phytopath. Z. **24**, 1—42.
10. HACKETT, D. P., 1957: Respiratory mechanisms in the Aroid spadix. J. Exp. Bot. **8**, 157—171.
11. JAMES, W. O., 1953: Plant respiration. Oxford.
12. KIRÁLY, Z., and G. L. FARKAS, 1957: On the role of ascorbic oxidase in the parasitically increased respiration of wheat. Arch. Biochem. Biophys. **66**, 474—484.
13. KOBA, S., 1958 a: Wound healings in cultivated plants. I. Wound penetration of the pathogenic bacteria of potato tuber. Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu. **16**, 397—401.
14. — —, 1958 b: Do. II. Oil-drop-like substances emerge in the wound reaction of potato tubers. Ibid. **16**, 403—410.
15. MAPSON, L. W., 1958: Metabolism of ascorbic acid in plants. Part. I. Function. Ann. Rev. Plant physiol. **9**, 119—150.
16. MILLERD, A., and K. SCOTT, 1956: Host pathogen relations in powdery mildew of barley. II. Change in respiratory pattern. Aust. J. Biol. Sci. **9**, 37—44.

17. Müller, K. O., 1953: The nature of resistance of the potato plant to blight — *Phytophthora infestans.* Journ. Nat'l. Inst. Agric. Botany **6,** 346—360.

18. — —, 1956: Einige einfache Versuche zum Nachweis von Phytoalexinen. Phytopath. Z. **27,** 237—254.

19. — —, 1958: Lecture in Fac. Agr., Univ. Hokkaido, Japan.

20. Rubin, B. A., and V. A. Aksenova, 1957: Participation of the polyphenolase system in the defense reactions of potato against *Phytophthora infestans.* Biokhimiya **22,** 202—209.

21. Shaw, M., and D. J. Samborski, 1957: The physiology of host-parasite relation. III. The pattern of respiration in rusted and mildewed cereal leaves. Canad. J. Bot. **35,** 389—409.

22. Suzuki, N., and S. Toyoda, 1957: Studies on the violet root rot of sweet potatoes caused by *Helicobasidium mompa* Tanaka, VII. (1) Histochemical studies of the infected tissues, (2) Stimulated respiration and behavior of phosphorus in infected tissues and their relation to defense reaction. Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. Ser. C **8,** 171—173.

23. Takakuwa, M., and K. Tomiyama, 1957: Cell physiological studies on resistance of potato plants to *Phytophthora infestans.* VI. The time required for the browning process of midrib cells induced by the infection with two different pathogenic strains of *Phytophthora infestans* in potatoes. Res. Bull. Hokkaido Nat'l. Agr. Exp. Sta. **73,** 94—99.

24. — —, — —, and B. Kato, (in preparation).

25. Tamari, K., 1957: Biochemistry of rice blast fungus (in Japanese). Plant protection (Japan) **11,** 233—239.

26. Thimann, K. V., C. S. Yocum and D. P. Hackett, 1954: Terminal oxidases and growth in plant tissue. III. Terminal oxidation in potato tuber tissue. Arch. Biochem. Biophy. **53,** 239—257.

27. Tomiyama, K., 1954: Cytological studies on resistance of potato plants to *Phytophthora infestans.* I. The processes of alteration in the host cell produced by invasion of parasite. Res. Bull. Hokkaido Nat'l. Agr. Exp. Sta. **67,** 28—38.

28. — —, 1955: Do. II. The death of the intracellular hyphae in the hypersensitive cell. Ann. Phytopath. Soc. Japan. **19,** 149—154.

29. — —, 1956 a: Do. III. The time required for the browning of midrib cell of potato plants infected by *Phytophthora infestans.* Ibid. **20,** 165—169.

30. — —, 1956 b: Do. IV. On the movements of cytoplasm of the host cell induced by the invasion of *Phytophthora infestans.* Ibid. **21,** 54—62.

31. — —, 1957 a: Do. V. Effect of 2.4-Dinitrophenol upon the hypersensitive reaction of potato plant cell to infection. Ibid. **22,** 75—78.

32. — —, 1957 b: Do. VII. Growth of intracellular hyphae of *Phytophthora infestans* in the living potato plant cells which are resistant or susceptible to the infection of them. Ibid. **22,** 129—133.

33. — —, 1957 c: Do. VIII. The influence of a pre-infectional heat treatment on the resistance of potato plant to *Phytophthora infestans.* Ibid. **22,** 237—242.

34. — —, 1959: Do. IX. (in preparation).

35. — —, N. Takase, R. Sakai and M. Takakuwa, 1956: Physiological studies on the defense reaction of potato plant to the infection of *Phytophthora infestans.* I. Changes in the physiology of potato tuber induced by the infection of *Phytophthora infestans* and their varietal differences. Res. Bull. Hokkaido Nat'l. Agr. Exp. Sta. **71,** 32—50.

36. — —, — —, and — —, 1955: Do. II. Changes in the physiology of potato tuber induced by the infection of the different strains of *Phytophthora infestans.* Ann. Phytopath. Soc. Japan **28,** 59—64.

37. Tomiyama, K., M. Takakuwa, N. Takase and R. Sakai, 1956: Do. III. The influence of pre-infectional ethanol narcosis upon the physiological reaction of potato tuber to the infection of *Phytophthora infestans* (part 1). Ibid. **21**, 17—22.

38. — —, R. Sakai, M. Takakuwá and N. Takase, 1957: Do. IV. Do. (part 2). Ibid. **21**, 153—158.

39. — —, M. Takakuwa and N. Takase, 1958: The metabolic activity in healthy tissue neighboring the infected cells in relation to resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in potatoes. Phytopath. Z. **31**, 237—250.

40. Uritani, I., and T. Akazawa, 1959: Alteration of the respiratory pattern in infected plants. Plant Pathology **1**, 349—390, Acad. Press, New York.

41. — —, — —, and M. Uritani, 1954: Increase of respiratory-rate in sweet potato tissue infected with black-rot. Nature **174**, 1060.

42. Yarwood, C. E., 1953: Heat of respiration of injured and diseased leaves. Phytopathology **43**, 675—681.

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Über die Schädigung der Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten durch einige Welketoxine[1])

Von

E. Gäumann und W. Obrist

Mit 7 Abbildungen

Sämtliche bis jetzt bekannten Welketoxine schädigen bestimmte Funktionen des Plasmas und seiner Organellen; dagegen sind sie, soweit in dieser Hinsicht geprüft (nämlich Diaporthin, Fusarinsäure, Fusarubin, Javanicin, Lycomarasmin, Lycomarasminsäure und Skyrin), beispielsweise nicht imstande, Mitosen zu hemmen.

In der vorliegenden Mitteilung möchten wir kurz über die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* und teilweise auch von *Spirogyra nitida* durch einige neuere Welketoxine berichten. Die toxigene Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten ist ja für den Pflanzenpathologen in doppelter Hinsicht wichtig; einerseits beeinflußt sie unmittelbar den Wasserhaushalt der erkrankenden Pflanzen; und andererseits bildet sie ein Indiz für das Bestehen von anderweitigen funktionellen Störungen, deren Auswirkungen in der „Schädigung der Wasserpermeabilität" für uns meßbar werden.

Richtungssinn und Ausmaß der Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten wurden an Hand der Deplasmolysemethode verfolgt, wie sie Bachmann (1956, 1957) für derartige Zwecke ausgebaut hat; dort sind auch die technischen Einzelheiten nachzulesen. Leider läßt sich diese Methode nicht bei allen Welketoxinen verwenden; so vermag sie bei Patulin im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-2} molar keine manifeste Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo-* und der *Spirogyra*-Protoplasten aufzuzeigen, obschon eine solche zweifelsohne erfolgt; denn das Patulin löst bei diesen Objekten schon in der Konzentration von 10^{-4} molar eine mikroskopisch erkennbare Koagulation des Plasmas aus. Hier wird man nach anderen Methoden suchen müssen.

1) Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unsern Dank wiederholen.

1. Diaporthin

Diaporthin ist ein von *Endothia parasitica* (Murr.) And., dem Erreger des Rindenkrebses der Edelkastanien, gebildetes Welketoxin von der Bruttoformel $C_{13}H_{14}O_5$ und dem Molekulargewicht 250 (BOLLER, GÄUMANN, HARDEGGER et al. 1957, KUGLER 1959). Es hemmt die Keimung der Brandsporen von *Ustilago zeae* bei der Konzentration von 0,05 mg/ml, diejenige der Konidien von *Alternaria tenuis* bei 0,1 mg/ml, und das Hyphenwachstum von *Rhizoctonia solani* bei 0,05 mg/ml. Bei Tomatensprossen löst es in Dosen zwischen 125 und 200 mg je kg Lebendgewicht visuelle Schädigungen, insbesondere Nekrosen am Stengel, aus (BAZZIGHER 1953, GÄUMANN und NAEF-ROTH 1957).

Für die hier zu besprechenden Versuche wurde das Diaporthin in der Konzentration von 10^{-3} molar in 5 % Äthanol gelöst und dann mit Aqua dest. stufenweise bis auf 10^{-12} molar verdünnt.

Die Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten setzt schon in der Konzentration von 10^{-11} molar ein (Abb. 1); doch sind die bei 10^{-11} und 10^{-10} molar gewonnenen Werte statistisch nicht gesichert. In einem ähnlichen Konzentrationsbereich (nur nicht so genau bestimmbar) liegt auch die Wirkungsschwelle für die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten der *Castanea*-Blätter.

Die funktionelle Schädigung der Protoplasten führt zunächst zu einer Herabsetzung ihrer Wasserpermeabilität, also zu einer Abdichtung; doch ist im vorliegenden Zusammenhange nicht in erster Linie der Richtungssinn der Verschiebung der Wasserpermeabilität wesentlich, sondern die Tatsache, daß die funktionellen Schädigungen der Zellen schon bei Konzentrationen von 10^{-11} und 10^{-10} molar ein Ausmaß erreichen, daß sie manifeste Verschiebungen der Wasserwegsamkeit der Protoplasten auslösen und an Hand dieser Verschiebungen unmittelbar gefaßt werden können.

Dieser Schwellenwert von 10^{-11} bzw. 10^{-10} molar liegt außerordentlich niedrig; denn bei 10^{-11} molar sind nur 0,0025 Gamma Diaporthin im Liter vorhanden, also eine nahezu homöopathische Substanzmenge. Diaporthin ist somit ein äußerst starkes Plasmagift, rund 100 mal stärker als beispielsweise Fusarinsäure. Immerhin bleibt zu beachten, daß Diaporthin durch den von uns verwendeten *Endothia*-Stamm nur in Mengen von etwa 1—2 mg je Liter Nährlösung gebildet wird, während z. B. das *Fusarium lycopersici* ceteris paribus bis etwa 250 mg kristallisierte Fusarinsäure produziert (STOLL, RENZ und GÄUMANN 1956). Wie sich freilich diese Relationen in vivo gestalten, entzieht sich unserer Kenntnis.

Mit wachsender Konzentration der Diaporthinlösung nimmt in Abb. 1 auch die Abdichtung der *Rhoeo*-Protoplasten zu. Bei der Konzentration von 10^{-8} molar erreicht sie ihren Tief- und Wendepunkt mit rund 60 % der normalen Wasserwegsamkeit. Hernach wird ein neuer Effekt sichtbar, der der Abdichtung entgegenwirkt, so daß die Permeabilitätskurve ansteigt und bei der Konzentration von 10^{-4} molar (d. i. bei 25 mg Diaporthin im Liter) wieder die Null-Linie (Quotient 1,0, d. h. keine meßbare Veränderung der Was-

serwegsamkeit der Protoplasten) erreicht. Höhere Diaporthinkonzentrationen wurden nicht geprüft, da eine störende Nebenwirkung des Lösungsmittels (Äthanol) zu befürchten war.

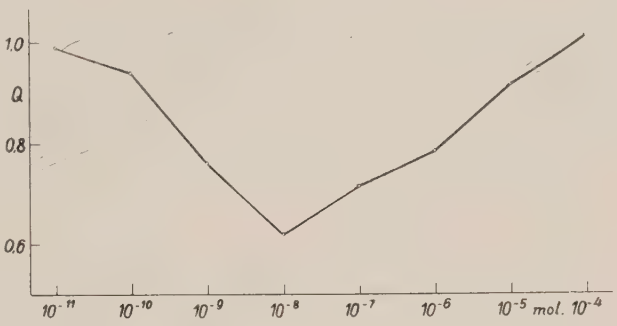


Abb. 1. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Diaporthin. Abszisse: Konzentration des Diaporthins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte über 1 eine Erhöhung, Werte unter 1 eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität bedeuten

2. Skyrin

Skyrin ist ein Bianthrachinon von der Formel $C_{30}H_{18}O_{10}$; es wurde ursprünglich von Howard und Raistrick (1954) aus Kulturen des *Penicillium islandicum* Sopp gewonnen und in seiner Konstitution aufgeklärt. Fast zu gleicher Zeit wurde es von Shibata und seinen Mitarbeitern (1953, 1955, 1956) aus dem Myzel von *Endothia parasitica* und *Endothia fluens* (Sow.) Shear et Stev. isoliert und von Orsenigo (1955) für *Endothiella gyrosa* Sacc. forma *Tamba* Sard. nachgewiesen.

Skyrin kann somit von weit auseinander liegenden Ascomyceten synthetisiert werden. Wenig spezifisch wie sein Bildungsspektrum ist auch sein Wirkungsspektrum, das von Bakterien und Pilzen bis zu Tomatengeweben reicht (Gäumann und Naef-Roth 1957). Für *Endothia parasitica*, die uns als Erreger des Kastaniensterbens in Süd- und Westeuropa besonders interessiert, stellt das Skyrin (neben dem Diaporthin) ein zweites Toxin dar.

Da Skyrin in hohen Konzentrationen nur bei einem pH von 8 und darüber in Lösung geht (es ist schlecht wasserlöslich, dagegen gut fettlöslich), wurde eine 10^{-3} molare Stammlösung in 0,1 normaler NaOH hergestellt und dann mit Aqua dest. stufenweise verdünnt; in den niederen Konzentrationen lag das pH um 6,0.

Die Schädigung der Wasserpermeabilität durch Skyrin wird in Abb. 2 sowohl bei *Rhoeo* als bei *Spirogyra* erst in Konzentrationen oberhalb 10^{-6} molar meßbar; sie führt, wie beim Diaporthin, bei beiden Objekten zu einer Abdichtung der Protoplasten. Bei der Konzentration von 10^{-3} molar wurden die Versuche abgebrochen; hier war die Wasserwegsamkeit der Protoplasten endgültig auf rund 60 % gesunken; eine Umkehr wie beim Diaporthin (Abb. 1) fand somit nicht statt. Das (stark rot gefärbte) Skyrin wurde bei der Konzentration von 10^{-3} molar in den Zellen derart angereichert, daß die Protoplasten von *Rhoeo* schmutzig dunkelrot, bei *Spirogyra* rotbraun gefärbt waren.

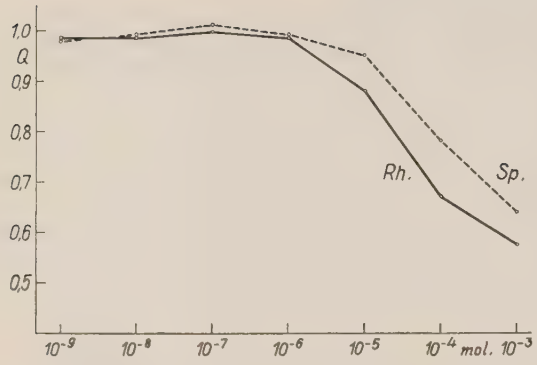


Abb. 2. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* (Kurve **Rh.**) und von *Spirogyra nitida* (Kurve **Sp.**) durch steigende Konzentrationen von Skyrin. Abszisse: Konzentration des Skyrins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte über 1 eine Erhöhung, Werte unter 1 eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität bedeuten

Gemessen an der Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten ist Skyrin rund 10 000 mal weniger giftig als Diaporthin; falls somit bei der Pathogenese des Kastaniensterbens die Schädigungen der Wasserpermeabilität der Protoplasten eine unmittelbare Rolle spielen würden, so wäre in erster Linie das Diaporthin der Träger dieser Wirkung und nicht das Skyrin. Die pflanzenpathogene Wirkung des Skyrins muß deshalb auf anderen Mechanismen beruhen; denn in anderen Wirkungssektoren, so bei der Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* und bei der Hemmung der Sporenkeimung von *Ustilago zeae* und *Alternaria tenuis*, ist das Skyrin ungefähr gleich giftig wie das Diaporthin (GÄUMANN und NAEF-ROTH 1957).

3. Enniatin

Enniatine sind phytotoxisch wirkende Polypeptide von besonderer Konfiguration (zyklische Tetrapeptoide). Das Enniatin A besitzt die Bruttoformel $C_{24}H_{42}O_6N_2$ und das Molekulargewicht 455; das Enniatin B mit der Bruttoformel $C_{22}H_{38}O_6N_2$ besitzt eine dem Enniatin A analoge Konstitution, unterscheidet sich aber von ihm durch den Minderbesitz von zwei CH_2-Gruppen (PLATTNER und NAGER 1947, 1948; PLATTNER, NAGER und BOLLER 1948; NAGER 1948; ZEHNDER 1951).

Beide Enniatine werden nebeneinander von mehreren Fusarien gebildet, so vom *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fusarium lateritium* Nees, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Fusarium sambucinum* Fckl. und *Fusarium scirpi* Lamb. et Fautr. (GÄUMANN, ROTH, ETTLINGER, PLATTNER und NAGER 1947; GÄUMANN, NAEF-ROTH und ETTLINGER 1950).

Die Enniatine wirken auf Tomatengewebe äußerst giftig; so liegt beim Enniatin A der Schwellenwert für eine deutliche Schädigung von Gewebestreifen aus Tomatenblättern bei der Konzentration von 10^{-6} molar (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER und AMMANN 1952). Makroskopisch schädigen sie bei Tomatenpflanzen vor allem die Stengel und verursachen dort schon in der Dosis von 15 mg je kg Lebendgewicht eine Nekrose der Gefäßbündel und einen rillenartigen Zerfall der Rindengewebe; hierüber wird demnächst in dieser Zeitschrift in einer anderen kleinen Arbeit berichtet.

Für die Messung der Wasserpermeabilitätsstörungen wurde jeweils eine $5 \cdot 10^{-4}$ molare Stammlösung in 10 % Äthanol hergestellt und stufenweise mit Aqua dest. verdünnt.

Das Enniatin A beginnt die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* schon bei der Konzentration von 10^{-7} molar manifest zu schädigen (Abb. 3); es verursacht zunächst eine Übersteigerung der Wasserpermeabilität, die bei der Konzentration von 10^{-5} molar ihren Höhepunkt mit rund dem 1,6fachen Wert erreicht und dann allmählich wieder zurückgeht. Bei *Spirogyra nitida* ist der Effekt ähnlich; nur sind dort die Werte wegen merkwürdig großer Streuungen statistisch nicht gesichert.

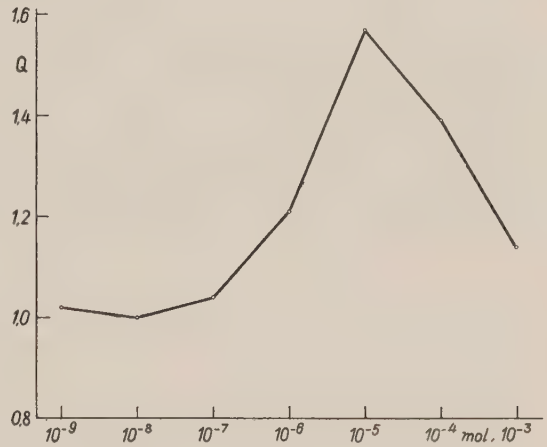


Abb. 3. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Enniatin A. Abszisse: Konzentration des Enniatins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte über 1 eine Erhöhung derselben bedeuten

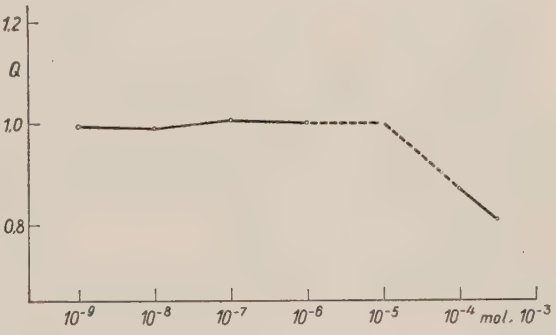


Abb. 4. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Enniatin B. Abszisse: Konzentration des Enniatins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte unter 1 eine Abdichtung der Protoplasten bedeuten. Der aus der Reihe fallende Meßpunkt bei der Konzentration von 10^{-5} molar ist statistisch nicht gesichert; der mutmaßlich „richtige" Verlauf der Schädigungskurve wurde deshalb in diesem Bereich durch Punktierung angedeutet

Auch beim Enniatin B sind die Werte für *Spirogyra nitida* statistisch nicht gesichert, so daß wir auf ihre Wiedergabe verzichten. Selbst bei *Rhoeo discolor* ist beim Enniatin B ein Wert, der überdies aus der Reihe fällt, statistisch nicht gesichert, nämlich der Meßwert bei 10^{-5} molar; wir deuten in Abbildung 4 den mutmaßlich „richtigen" Kurvenverlauf punktiert an. Die Einwirkung des Enniatins B auf die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten gestaltet sich völlig anders als diejenige des Enniatins A: das Enniatin B löst bei ihnen keine Übersteigerung der Wasserpermeabilität aus, son-

dern beginnt sehr spät, bei der Konzentration von rund 10^{-5} molar, die Wasserpermeabilität herabzusetzen, also die Protoplasten abzudichten.

4. Baccatin

Das Baccatin A, ein Toxin von der Formel $C_{26}H_{48}O_6N_2$, wurde zuerst von GUÉRILLOT-VINET, GUYOT, MONTÉGUT und ROUX (1950) aus dem Myzel und aus der Nährlösung eines französischen Stammes von *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. (Nebenfruchtform *Fusarium lateritium* Nees) isoliert und in neuerer Zeit von unserer Mitarbeiterin Frau Dr. ST. NAEF-ROTH auch in Material schweizerischer Herkunft nachgewiesen.

Es ist jedoch, wie die Herren G. HALL und W. KELLER-SCHIERLEIN vom organisch-chemischen Institut unserer Hochschule durch Infrarotspektroskopie und durch Herstellung zahlreicher Abbauprodukte zeigen konnten, nicht eine einheitliche Substanz, sondern ein sehr schwer trennbares Gemisch der Enniatine A und B, die in einem Verhältnis von etwa 1 : 3 vorliegen. Mit dieser chemischen Deutung stimmt überein, daß COOK, COX, FARMER und LACEY schon im Jahre 1947 aus einem englischen Stamm des *Fusarium lateritium* Nees (das ja die Nebenfruchtform der *Gibberella baccata* darstellt) das Enniatin A (ihr Lateritiin I) isoliert haben.

Für die Messung der durch das Baccatin A bei den Protoplasten von *Rhoeo discolor* und von *Spirogyra nitida* ausgelösten Störungen der Wasserpermeabilität wurde eine 10^{-3} molare Stammlösung in 5 % Äthanol hergestellt und dann stufenweise mit Aqua dest. verdünnt. Bei *Rhoeo* wird die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten erst bei der Konzentration von 10^{-5} molar manifest (Abb. 5), bei *Spirogyra* bei 10^{-6} molar. Bei beiden Objekten führt sie unmittelbar zu einer deutlichen Abdichtung der Protoplasten.

Das Baccatin A (Abb. 5) schädigt somit die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten in genau der gleichen Weise wie das Enniatin B (Abb. 4); die rund 25 % Enniatin A (Abb. 3), die in ihm enthalten sind, werden im Sektor „Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten" durch die rund 75 % Enniatin B vollkommen ausgelöscht. Es wird durch besondere Untersuchungen zu klären sein, ob hierbei irgendwelche innermolekularen Vorgänge eine Rolle spielen.

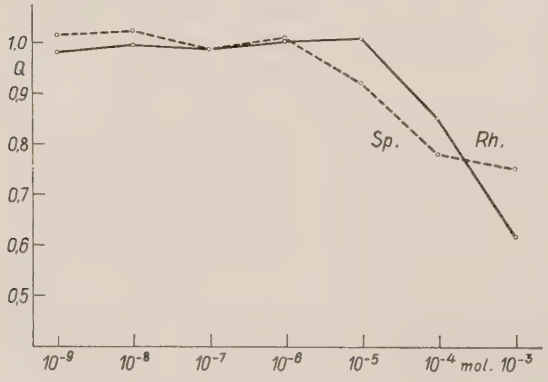


Abb. 5. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* (Kurve Rh.) und von *Spirogyra nitida* (Kurve Sp.) durch steigende Konzentration von Baccatin A. Abszisse: Konzentration des Baccatins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei die Werte unter 1 eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität bedeuten

5. Lycomarasminsäure

Lycomarasminsäure $C_9H_{14}O_8N_2$ ist ein Abbauprodukt des Lycomarasmins und unterscheidet sich von diesem durch den Minderbesitz von ein Mol Ammoniak. Noch weiter abgebaut ist die Substanz J mit der Formel $C_9H_{12}O_7N_2$; sie enthielt eine Molekel Wasser weniger als Lycomarasminsäure (Liechti 1958).

Lycomarasmin und Lycomarasminsäure lösen bei Tomatensprossen dieselben visuellen Schädigungen aus; nur ist Lycomarasminsäure rund dreimal giftiger als Lycomarasmin. Die Substanz J ist dagegen welke-inaktiv, da sie keine Schwermetallionen zu chelieren vermag (Gäumann und Naef-Roth 1959).

Lycomarasmin vermag für sich allein die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* nicht zu schädigen. Werden dagegen zu einer Lycomarasminlösung steigende Mengen von Eisenionen gegeben, so cheliert im koordinativen Bindungsbereich eine Lycomarasminmolekel ein Eisenion zum Lycomarasmin-Eisen-Komplex; dieser löst im biologisch sinnvollen Konzentrationsbereich eine Übersteigerung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten aus (Gäumann und Bachmann 1957).

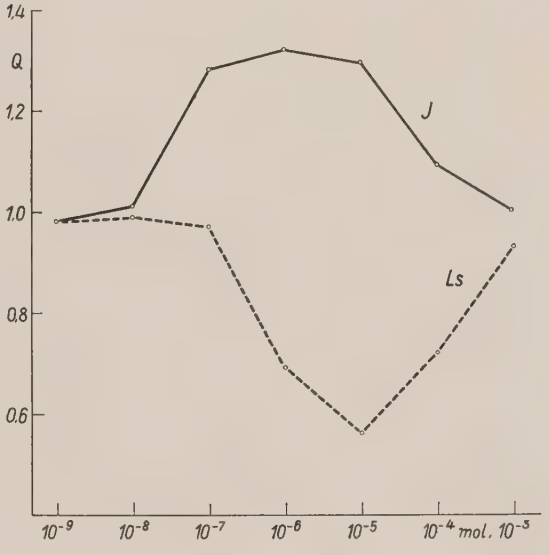


Abb. 6. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Lycomarasminsäure (Kurve Ls) und der Substanz J (Kurve J). Abszisse: Konzentration der beiden Toxine in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte über 1 eine Erhöhung, Werte unter 1 eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität bedeuten

Da sowohl die Lycomarasminsäure als die Substanz J wasserlöslich sind, konnte ihre Einwirkung auf die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten ohne Zwischenschaltung eines Lösungsmittels geprüft werden (Abb. 6). Überraschenderweise vermögen beide Substanzen unmittelbar als solche (also nicht nur in Gestalt ihres Eisenkomplexes) die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten zu schädigen; dies ist für die Substanz J um so erstaunlicher, als sie ja bei Tomatensprossen keine visuellen Schädigungen auslöst. Der Richtungssinn der Schädigung ist jedoch bei den zwei Substanzen verschieden.

Die Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten durch Lycomarasminsäure setzt bei der Konzentration von 10^{-7} molar ein und führt zu einer Herabsetzung derselben (also zu einer Abdichtung der Protoplasten); sie erreicht bei der Konzentration von 10^{-5} molar ihren Tiefpunkt, ändert hernach ihren Richtungssinn und kehrt bei der Konzentration von 10^{-3} molar nahezu wieder zur Ausgangslage zurück. Die Schädigungskurve der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten verläuft somit ähnlich wie beim Diaporthin (Abb. 1), nur um rund das Tausendfache nach der Richtung geringerer Giftigkeit verschoben.

Die Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten durch die Substanz J setzt in einem ähnlichen Konzentrationsbereich ein wie bei der Lycomarasminsäure, nämlich bei 10^{-8} molar, führt jedoch zu einer Übersteigerung derselben; sie durchläuft zwischen den Konzentrationen von 10^{-7} und 10^{-5} molar einen breiten Scheitel, ändert dann den Richtungssinn und erreicht bei der Konzentration von 10^{-3} molar wieder den Ausgangspunkt. Währenddem somit die Schädigungskurve der Lycomarasminsäure dem Diaporthintypus folgt, entspricht die Schädigungskurve der Substanz J einem konträren Verhalten, das wir nun sogleich im nächsten Abschnitt (Abb. 7) beim Fusarubin wieder antreffen werden.

6. Javanicin und Fusarubin

Javanicin und Fusarubin sind beides rote Pilzfarbstoffe; chemisch stellen sie verhältnismäßig einfach gebaute Naphthochinone dar.

Das Javanicin (= Solanion im Sinne von WEISS und NORD 1949) mit der Bruttoformel $C_{15}H_{14}O_8$ wurde zuerst von ARNSTEIN, COOK und LACEY (1946) und ARNSTEIN und COOK (1947) aus dem Myzel des *Fusarium javanicum* Kds. isoliert. Die chemische Literatur findet sich bei KUGLER (1959) zusammengestellt. Das Javanicin schädigt im Welketest mit jungen Tomatensprossen vor allem die Stengel; die dosis minima beträgt rund 60 mg je kg Frischgewicht. Das Wachstum einiger Bakterien, so von *Bacillus subtilis* und von *Micrococcus pyogenes*, und die Keimung der Brandsporen von *Ustilago zeae* werden durch eine Javanicinkonzentration von 0,05 mg/ml auf die Hälfte herabgesetzt. Ferner hemmt Javanicin beispielsweise das Wachstum

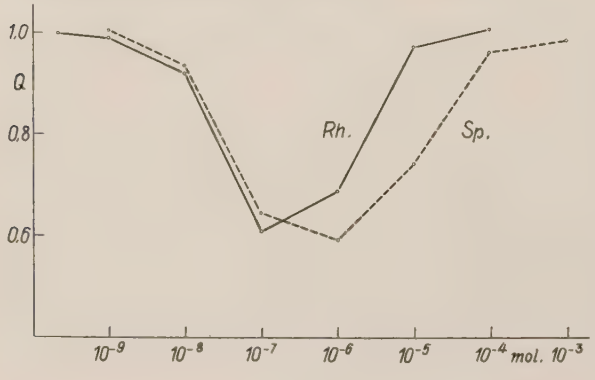


Abb. 7. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* (Kurve **Rh.**) und von *Spirogyra nitida* (Kurve **Sp.**) durch steigende Konzentrationen von Fusarubin. Abszisse: Konzentration des Fusarubins in Molaritäten. Ordinate: Schädigung der Wasserpermeabilität, wobei Werte unter 1 eine Herabsetzung derselben bedeuten

von *Fusarium lateritium* Nees und von *Fusarium sambucinum* Fckl., was möglicherweise für den Verlauf von Mischinfektionen in den Geweben von Kartoffelknollen bedeutungsvoll ist.

Das Fusarubin (= Oxyjavanicin im Sinne von Arnstein, Cook und Lacey 1946) mit der Bruttoformel $C_{15}H_{14}O_7$ wurde von Ruelius und Gauhe (1950) aus dem Myzel des *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. isoliert und in neuerer Zeit von unserer Mitarbeiterin Frau St. Naef-Roth auch aus Kulturen des *Fusarium Martii* App. et Wr. gewonnen. Die chemische Literatur wurde von Kugler (1959) zusammengestellt. Das Fusarubin schädigt im Welketest mit jungen Tomatensprossen, ähnlich wie das Javanicin, vor allem die Stengel; es ist jedoch etwas giftiger als dieses: die dosis minima beträgt rund 40 mg je kg Frischgewicht. Gegen *Bacillus subtilis* und *Micrococcus pyogenes* wirkt es ähnlich wie Javanicin, gegen *Ustilago zeae* dagegen rund doppelt so giftig. Das Fusarubin läßt sich, wie schon Ruelius und Gauhe (1950) zeigten, chemisch unmittelbar in Javanicin überführen.

Bei den Protoplasten von *Rhoeo discolor* und von *Spirogyra nitida* erwies sich das Javanicin im Sektor „Schädigung der Wasserpermeabilität" als wirkungslos. Das Fusarubin löst dagegen in den Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} molar eine Abdichtung der betreffenden Protoplasten aus; die Kurven der Abbildung 7 verlaufen (abgesehen von den anderen Konzentrationsbereichen) ähnlich wie diejenigen des Diaporthins (Abb. 1) und der Lycomarasminsäure (Abb. 6).

7. Allgemeine Betrachtungen

Von den elf näher untersuchten Welketoxinen vermögen zwei, nämlich Lycomarasmin und Javanicin, die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten nicht unmittelbar zu schädigen. Lycomarasmin wird in diesem Sektor erst in Gestalt des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes pathogen, d. h. erst wenn seine Molekeln ein Eisenion cheliert haben (Gäumann und Bachmann 1957). Beim Javanicin ist über den Schädigungsmechanismus noch nichts bekannt.

Bei den übrigen neun Welketoxinen, welche die Wasserpermeabilität der Protoplasten unmittelbar schädigen, ist diese Schädigung pflanzenpathologisch nicht nur als solche (wegen der damit verbundenen Störung des Wasserhaushaltes der betreffenden Pflanzen) wichtig, sondern in erhöhtem Maße auch deshalb, weil sie ein Indiz für das Bestehen anderweitiger funktioneller Störungen bildet, die sich in irgendeiner Weise in einer Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten auswirken, aber zur Zeit als solche noch nicht gefaßt werden können.

Zwei Gesichtspunkte sind bei der Betrachtung dieser Schädigungen wesentlich, einerseits die Konzentrationsschwelle, bei der die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten bei den verschiedenen Welketoxinen manifest zu werden beginnt, und sodann die Richtung, in der die Wasserpermeabilität der Protoplasten durch wachsende Konzentrationen der Toxine verschoben wird.

a) Die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der Wasserpermeabilität

Bei sämtlichen hier zur Diskussion stehenden Untersuchungen wurde als Modellobjekt aus methodischen Gründen die Epidermis der Blattunterseite von *Rhoeo discolor* verwendet. Doch wissen wir noch nicht, wie weit *Rhoeo discolor* für die gegen Welkekrankheit anfälligen Angiospermen repräsentativ ist; immerhin lieferten die wenigen in dieser Hinsicht geprüften Gewebe, so das Mesophyll aus Tomaten- und aus Kastanienblättern, bis auf etwa eine Zehnerpotenz ähnliche Werte. Die Zellen von *Spirogyra nitida* gehen hingegen zuweilen ihre eigenen Wege.

Die neun hier zu betrachtenden Welketoxine beginnen die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* bei den folgenden Konzentrationen (in Molaritäten) zu schädigen:

Diaporthin 10^{-11}	Lycomarasminsäure 10^{-7}
Fusarubin 10^{-9}	Skyrin 10^{-6}
Fusarinsäure 10^{-9}	Enniatin B 10^{-5}
Dehydrofusarinsäure 10^{-8}	Baccatin 10^{-5}
Enniatin A 10^{-7}	

Die Wirkungsschwellen für die Schädigung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten liegen somit zwischen den Konzentrationen von 10^{-11} und 10^{-5} molar, also um rund den 1-Million-fachen Betrag auseinander; am stärksten wirkt Diaporthin mit einer Konzentrationsschwelle von 10^{-11} molar, am wenigsten giftig sind Enniatin B und Baccatin mit einer Konzentrationsschwelle von 10^{-5} molar.

Diese Toxizitätsschwellen gelten naturgemäß nur für die Schädigung jener Mechanismen, die mit der Wasserpermeabilität der Protoplasten in Beziehung stehen. In anderen Wirkungssektoren (sämtliche Welketoxine wirken wahrscheinlich pleiotrop) bestehen unter Umständen völlig abweichende Wirkungsschwellen; so ist das Diaporthin für die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten mindestens 10 000 mal giftiger als das Skyrin, während es anderseits für die Auslösung visueller Schädigungen an Tomatensprossen nur rund doppelt so giftig wirkt wie dieses.

Zwischen der Lage der Toxizitätsschwelle einerseits und dem Ausmaß der maximal möglichen Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten anderseits besteht keine unmittelbare Beziehung; so setzen sowohl Diaporthin, das die *Rhoeo*-Protoplasten bei der Konzentration von 10^{-11} molar manifest zu schädigen beginnt (Abb. 1), als Skyrin, dessen manifeste Wirkung erst bei der Konzentration von 10^{-6} molar anhebt (Abb. 2), die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten auf rund 60 % herab.

b) Der Richtungssinn der Verschiebung der Wasserpermeabilität

Nach der Art, wie die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten durch steigende Konzentrationen eines Welketoxines verschoben wird, lassen sich vier Typen unterscheiden.

1. Der Skyrintypus. Er wird durch die drei am wenigsten giftigen Toxine unserer Liste vertreten, nämlich durch Skyrin (Abb. 2), Enniatin B (Abb. 4) und Baccatin (Abb. 5). Die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten wird bei diesem Typus durch wachsende Konzentrationen in steigendem Maße herabgesetzt. Es sieht aus, als ob ein einfacher Abdichtungseffekt vorläge.

Der spiegelgleiche Typus, bei dem die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten durch steigende Konzentrationen eines Welketoxines in zunehmendem Maße übersteigert wird, liegt zur Zeit noch nicht vor; hingegen wurde er unter künstlichen Bedingungen beobachtet: wenn in einer Lycomarasminlösung sämtliche Lycomarasminmolekeln ein Eisenion cheliert haben, so bewirkt die Lösung bei steigender Konzentration eine zunehmende Übersteigerung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten (Gäumann und Bachmann 1957, Abb. 3).

2. Der Diaporthintypus, vertreten durch Diaporthin (Abb. 1), Lycomarasminsäure (Abb. 6) und Fusarubin (Abb. 7). Die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten wird bei diesem Typus durch steigende Toxinkonzentrationen zunächst in zunehmendem Maße herabgesetzt; dann ändert die Permeabilitätskurve ihren Richtungssinn und kehrt schließlich zum Ausgangsniveau (keine meßbare Veränderung der Wasserpermeabilität) zurück.

Der Tiefpunkt der Abdichtungskurve liegt bei den drei Toxinen bei unterschiedlichen Konzentrationen, nämlich bei 10^{-8} molar für Diaporthin, bei 10^{-7} molar für Fusarubin und bei 10^{-5} molar für Lycomarasminsäure; dagegen ist das absolute Ausmaß der Drosselung der Wasserpermeabilität bei allen drei Toxinen ungefähr gleich groß (Herabsetzung auf rund 60 %).

3. Der Enniatintypus, bis jetzt bekannt für das Enniatin A (Abb. 3) und die Substanz J (Abb. 6). Er zeigt den spiegelgleichen Kurvenverlauf des Diaporthintypus: die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten wird zunächst übersteigert; dann ändert die Schädigungskurve ihren Richtungssinn und kehrt auf das Ausgangsniveau zurück.

4. Der Fusarinsäuretypus, vertreten durch die Fusarinsäure (Bachmann 1956) und die Dehydrofusarinsäure (Bachmann, Renz und Stoll 1957). Bei diesem Typus erfolgt zunächst zwischen den Konzentrationen von 10^{-9} bis ungefähr $5 \cdot 10^{-5}$ molar eine Übersteigerung der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten (mit einem ausgeprägten Gipfel bei 10^{-7} molar) und hernach (bei Konzentrationen oberhalb 10^{-4} molar) in zunehmendem Maße eine Abdichtung der Protoplasten.

Beim Fusarinsäuretypus wird somit der Enniatin A-typus (Abb. 3) mit dem Skyrintypus (Abb. 2) kombiniert.

Diese vier Reaktionstypen lassen erkennen, daß die *Rhoeo*-Protoplasten auf die verschiedenen Welketoxine in unterschiedlicher Weise ansprechen; sie werden also offenbar von ihnen in unterschiedlicher Weise funktionell geschädigt. Über die Natur der (zweifelsohne sehr komplexen) funktionellen

Schädigungen, die schlußendlich zu den verschiedenartigen Verschiebungen der Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten führen, herrscht noch völliges Dunkel.

Zusammenfassung

Bei den neun Welketoxinen, welche die Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* unmittelbar schädigen, liegen die Wirkungsschwellen um ungefähr den 1-Million-fachen Betrag auseinander; am stärksten wirkt in dieser Hinsicht Diaporthin mit einer Konzentrationsschwelle von 10^{-11} molar, am schwächsten Enniatin B und Baccatin mit einer Konzentrationsschwelle von 10^{-5} molar. Doch gelten diese Toxizitätsschwellen nur für die Schädigung jener Mechanismen, die mit der Wasserpermeabilität der Protoplasten in Beziehung stehen. In anderen Wirkungssektoren bestehen unter Umständen völlig abweichende Wirkungsschwellen; so ist das Diaporthin für die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten mindestens 10 000 mal giftiger als das Skyrin, während es anderseits für die Auslösung visueller Schädigungen an Tomatensprossen nur rund doppelt so giftig wirkt wie dieses.

Nach der Art, wie die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten durch steigende Konzentrationen eines Welketoxines verschoben wird, lassen sich vier Typen unterscheiden. Beim Skyrintypus, vertreten durch Skyrin (Abb. 2), Enniatin B (Abb. 4) und Baccatin (Abb. 5), wird die Wasserpermeabilität durch wachsende Toxinkonzentrationen in steigendem Maße herabgesetzt. Beim Diaporthintypus, vertreten durch Diaporthin (Abb. 1), Lycomarasminsäure (Abb. 6) und Fusarubin (Abb. 7), wird die Wasserpermeabilität durch steigende Toxinkonzentrationen zunächst in zunehmendem Maße herabgesetzt; dann ändert die Permeabilitätskurve ihren Richtungssinn und kehrt schließlich zum Ausgangsniveau (keine meßbare Veränderung der Wasserpermeabilität) zurück. Der Enniatintypus, vertreten durch Enniatin A (Abb. 3) und die Substanz J (Abb. 6), zeigt den spiegelgleichen Kurvenverlauf des Diaporthintypus. Beim Fusarinsäuretypus endlich, vertreten durch Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure, findet sich der Enniatin A-Typus mit dem Skyrintypus kombiniert. Das Bestehen von derart abweichenden Reaktionstypen läßt vermuten, daß die *Rhoeo*-Protoplasten durch die verschiedenen Welketoxine funktionell in unterschiedlicher Weise geschädigt werden.

Summary

The nine wilt toxins which directly influence the water permeability of the protoplasts of *Rhoeo discolor* vary greatly with respect to the concentrations at which they are active. For example, there is approximately a millionfold difference between the strongest, diaporthin, which initiates activity at a concentration of 10^{-11} M., and the weakest, enniatin B and baccatin, active at 10^{-5} M. However, these concentrations are only valid for the

mechanisms responsible for changing the water permeability of the protoplasts. For other effects there exist completely divergent concentrations. Thus, in altering the water permeability of the protoplasts, diaporthin is at least 10.000 times as effective as skyrin, whereas in inducing visual injury to tomato shoots the former is only twice as toxic.

The manner in which the water permeability of *Rhoeo* protoplasts is varied by increasing concentrations of a given wilt toxin permits four toxin-types to be differentiated. Thus the skyrintype, exemplified by skyrin (figure 2), enniatin B (figure 4) and baccatin (figure 5), decreases permeability as its concentration increases. With the diaporthin-type, of which diaporthin (figure 1), lycomarasmic acid (figure 6) and fusarubin (figure 7) are representative, increasing concentrations at first decrease the water permeability; then the permeability curve changes direction and returns to its initial level (no measurable change in permeability). The enniatin-type, characterized by enniatin A (figure 3) and substance "J" (figure 6), elicits curves which are mirror images of the diaporthin-type. Finally, the fusaric acid-type, typified by fusaric acid and dehydrofusaric acid, is a combination of the enniatin A- and skyrin-types.

The existence of such divergent reaction-types permits the conjecture that the metabolic processes of *Rhoeo* protoplasts are altered by the various wilt toxins in distinctly different ways.

Literaturverzeichnis

Arnstein, H. R. V., and A. H. Cook, 1947: Production of antibiotics by fungi. Part III. Javanicin, an antibacterial pigment from *Fusarium javanicum*. J. Chem. Soc. London. 1021—1028.

— —, — — and M. S. Lacey, 1946: Production of antibiotics by fungi. Part II: Production by *Fusarium javanicum* and other Fusaria. Brit. J. Exper. Pathol. **27**, 349—355.

Bachmann, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

— —, 1957: Über den Einfluß von Pyridin und Pyridin-Derivaten auf die Wasserpermeabilität von *Spirogyra nitida* und *Rhoeo discolor*. Phytopath. Z. **29**, 177—184.

— —, J. Renz und Ch. Stoll, 1957: Über den Einfluß von welkeaktiven Stoffen aus *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **30**, 275—280.

Bazzigher, G., 1953: Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And., dem Erreger des Kastaniensterbens. Phytopath. Z. **21**, 105—132.

Boller, A., E. Gäumann, E. Hardegger, F. Kugler, St. Naef-Roth und M. Rosner, 1957: Diaporthin, ein Welketoxin aus Kulturen von *Endothia parasitica* (Murr.) And. Helv. Chim. Acta XL, 875—880.

Cook, A. H., S. F. Cox, T. H. Farmer and M. S. Lacey, 1947: Production of Antibiotics by Fusaria. Nature **160**, 31—32.

Gäumann, E., und E. Bachmann, 1957: Über den Einfluß des Lycomarasmins und seiner Schwermetallkomplexe auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. Phytopath. Z. **29**, 265—276.

Gäumann, E., und St. Naef-Roth, 1957: Über die Toxine der *Endothia parasitica* (Murr.) And. Pflanzenschutzberichte Wien, **19**, 9—16.

— —, und — —, 1959: Über Lycomarasminsäure, ein Umwandlungsprodukt des Lycomarasmins. Phytopath. Z. **34**, 426—431.

— —, — — und L. Ettlinger, 1950: Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. Phytopath. Z. **16**, 289—299.

— —, — —, P. Reusser und A. Ammann, 1952: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. Phytopath. Z. **19**, 160—220.

— —, — —, L. Ettlinger, Pl. A. Plattner und U. Nager, 1947: Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibioticum. Experientia **3**, S. 202.

Guérillot-Vinet, M., et Mme. J., L. Guyot, J. Montégut et L. Roux, 1950: Sur une substance antibiotique extraite du mycélium de *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. Compt. r. Acad. Sci. Paris **230**, 1424—1426.

Howard, B. H., and H. Raistrick, 1954: Studies in the biochemistry of Micro-organisms. 91. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Biochem. J. **56**, 56—65.

Kugler, Fr., 1959: Über welkeaktive Inhaltsstoffe von *Endothia parasitica* (Murr.) And. und *Fusarium solani* (Mart.) v. Martii. Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, Nr. 2816, 63 S.

Liechti, P., 1958: Über Lycomarasmin. Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, Nr. 2789, 57 S.

Nager, U., 1948: Über die Chemie der Enniatine. Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, 42 S.

Orsenigo, M., 1955: Esame spettrofotometrico di estratti alcolici di colture di *Endothia*. N. Giorn. Bot. Ital., N. S. **62**, 365—368.

Plattner, Pl. A., und U. Nager, 1947: Über die Chemie des Enniatins. Experientia **3**, 325—326.

— —, und — —, 1948: Über die Konstitution von Enniatin B. Helv. Chim. Acta **31**, 665—671.

— —, und — —, 1948: Über die Konstitution von Enniatin A. Helv. Chim. Acta **31**, 2192—2203.

— —, und — —, 1948: Analyse und Charakterisierung der Enniatine. Über das Verhalten von N-Methyl-aminosäuren im Papierchromatogramm. Helv. Chim. Acta **31**, 2203 bis 2209.

— —, — — und A. Boller, 1948: Welkestoffe und Antibiotika VII. Über die Isolierung neuartiger Antibiotika aus Fusarien. Helv. Chim. Acta **31**, 594—602.

Ruelius, H. W., und A. Gauhe, 1950: Über Fusarubin, einen Naphthochinonfarbstoff aus Fusarien. Liebigs Annalen d. Chemie **569**, 38—59.

— —, 1950: Über einen Oxynaphthochinon-schwefelsäureester aus Fusarien. Liebigs Annalen d. Chemie **570**, 121—126.

Shibata, Sh., T. Murakami, I. Kitagawa and M. Takido, 1956: On the fungal coloring matters. The structures of Rugulosin, Rubroskyrin and Flavoskyrin. Proc. Japan Acad. **32**, 356—360.

— —, — —, O. Tanaka, G. Chihara and M. Sumimoto, 1955: Metabolic products of fungi IV. Isolation of the coloring matters of *Endothia* spp. and the respective identities of Endothianin and Radicalisin with Skyrin and Rugulosin. Pharm. Bull. Japan **3**, 274—286.

— —, O. Tanaka, G. Chihara and H. Mitsuhashi, 1953: Coloring matter produced by *Endothia parasitica* and *Endothia radicalis*. Pharm. Bull. Japan **1**, 302—304.

Stoll, Chr., J. Renz und E. Gäumann, 1957: Über die Bildung von Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure durch das *Fusarium lycopersici* Sacc. in saprophytischer Kultur. Phytopath. Z. **29**, 388—394.

Weiss, S., and F. F. Nord, 1949: On the mechanism of enzyme action XXXVII. Solanione, a pigment from *Fusarium solani*. Arch. of Biochem. **22**, 288—313.

Zehnder, K., 1951: Über die Konstitution der N-Methyl-aminosäuren aus Enniatin A und B. Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, Nr. 1983, 96 S.

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. H. Braun

Einfluß der Vortemperatur auf die Pathogenität einiger Pilze und ihr Wachstum in vitro

Von

J. Kranz

Frühere Versuche ergaben, daß die Pathogenität von *Phoma foveata* Foister für Kartoffelknollen um so mehr zunimmt, je tieferen Temperaturen der Pilz vor der Infektion ausgesetzt war (Kranz 1958). Diese Beziehungen zwischen Vortemperatur und Pathogenität sind im Bereich von 4 ° bis 21 °C geradlinig. Weitere Versuche mit anderen Erregern von Knollenfäulen sollten zeigen, inwieweit sich dieses Ergebnis verallgemeinern läßt und ob Wachstum in vitro und Pathogenität gleichsinnig auf die Vortemperatur reagieren.

Für die Untersuchungen wurden *Alternaria porri* (E. M.) Neerg. f. sp. *solani* (= *A. solani* E. et M.), *Botrytis cinerea* Pers. und *Fusarium caeruleum* (Lib.) Sacc. verwendet, isoliert von Kartoffel- und Tabakblatt bzw. Kartoffelknolle. *A. solani* und *F. caeruleum* sind als Erreger von Trockenfäulen der Kartoffelknolle bekannt. Mit *B. cinerea* hatte Folsom (1933) an normalen Kartoffelknollen Infektionserfolge bis zu 100 %, wenn er sie mit jungem, kräftigem Myzel dieses Pilzes infizierte und anschließend bei 5 °C lagerte.

Versuchsanstellung und Ergebnisse

Die Versuche wurden in den Monaten November und Dezember durchgeführt. Erfahrungsgemäß sind zu dieser Zeit die meisten Kartoffelsorten auch anfällig für Parasiten mit geringerer Pathogenität als *F. caeruleum*, ohne jedoch im Stadium maximaler Anfälligkeit zu sein, in dem Pathogenitätsunterschiede überhaupt nicht mehr hervortreten. Nachdem die Pilze bei 20 °C Biomalz-Agar (2 % Biomalz, 1,8 % Agar-Agar) in Petrischalen von 40 mm Durchmesser voll bewachsen hatten, wurden die Kulturen 14 Tage bei 3,1 bis 3,4 °, 15,2 bis 15,4 ° und 24,2 bis 24,5 °C aufgestellt. Da das Wachstumsoptimum der benutzten Pilze zwischen 15 ° und 25 °C liegt, waren Myzeldichte, Luftmyzel und Substratfärbung bei 24 °C Vorbehandlung am stärksten; *B. cinerea* hatte sogar die ersten Sklerotien gebildet. Anschließend wurden zweimal im Abstand von 6 bis 7 Wochen je fünf Knollen der Sorte

Sieglinde am Kronen- und Nabelende mit myzeldurchwachsenen Agarstückchen von 5 mm Durchmesser aus zwei Petrischalen jeder Temperatur infiziert, indem das Inokulum unter die im V-Schnitt gelöste Schale geschoben und die Wunde mit Paraffin verschlossen wurde. Die infizierten Knollen lagerten 14 Tage bei 15 bis 16 °C (*A. solani, F. caeruleum*) oder 4 °C (*B. cinerea*). Mit Myzel derselben Kulturen wurden gleichzeitig vier 100-ccm-Erlenmeyerkolben (mit 25 ccm Biomalzlösung) beimpft und 10 Tage bei 20 bis 21 °C gehalten. Anschließend wurde das Myzeltrockengewicht bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 zusammengestellt.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Pathogenität von der Vortemperatur
(Vier Wiederholungen mit je zehn Infektionen)

Pilz	Infektion am	Vortemperatur in °C						F =
		3,1 bis 3,4		15,2 bis 15,4		24,2 bis 24,5		
		krank	Nekrosentiefe mm	krank	Nekrosentiefe mm	krank	Nekrosentiefe mm	
A. porri f. sp. *solani* ..	17. 11.	10	1,6	10	1,5	10	1,6	
		10	1,5	10	1,4	10	1,5	
	28. 12.	10	2,7	10	2,6	10	2,9	
		10	2,9	10	2,6	10	2,6	
B. cinerea	14. 11.	9	3,7	0	—	0	—	
		10	4,0	0	—	0	—	
	24. 12.	7	5,8	1	5,0	0	—	
		7	8,4	6	6,4	0	—	
F. caeruleum	20. 11.	9	5,5 ± 0,2	10	5,7 ± 1,2	10	6,6 ± 1,1	3,3
		2		10	6,3 ± 0,2	10	6,2 ± 1,4	—
	28. 12.	10	4,7 ± 1,5	9	5,0 ± 1,2	8	4,9 ± 0,9	7,0
		10	3,8 ± 1,4	10	4,5 ± 0,2	10	5,4 ± 1,2	5,6

Überschreitungswahrscheinlichkeit P 5 % = 3,37, P 1 % = 5,78 bzw. P 5 % = 19,45 (für dritte Wiederholung!).

Tabelle 2

Abhängigkeit des mittleren Myzeltrockengewichts in mg von der Vortemperatur

Pilz	Infektion am	Vortemperatur in °C			F =
		3,1 bis 3,4	15,2 bis 15,4	24,2 bis 24,5	
A. porri f. sp. *solani* ..	17. 11.	50,5 ± 22,4	34,5 ± 4,5	37,8 ± 3,3	1,6
	28. 12.	55,0 ± 3,0	45,0 ± 7,9	49,0 ± 5,8	2,1
B. cinerea	14. 11.	97,6 ± 28,2	119,2 ± 9,0	94,2 ± 8,1	2,3
	24. 12.	89,0 ± 32,2	124,2 ± 8,3	93,0 ± 13,1	3,2
F. caeruleum	20. 11.	36,0 ± 12,4	31,5 ± 5,8	27,8 ± 3,3	1,0
	28. 12.	30,3 ± 10,3	27,3 ± 3,5	31,3 ± 5,0	3,1

Überschreitungswahrscheinlichkeit P 5 % = 4,26.

Was zunächst die Abhängigkeit der Pathogenität von der Vortemperatur betrifft, so erwies sich *B. cinerea* nur nach niedriger Vortemperatur pathogen. Nach 15 °C Vortemperatur rief der Pilz nur in Ausnahmefällen Fäulen hervor, wobei sich neben unterschiedlicher Pathogenität der Kulturen offenbar auch die mit fortschreitender Jahreszeit zunehmende Anfälligkeit der Knollen bemerkbar machte. Bei 24 °C Vortemperatur war *B. cinerea* apathogen. Umgekehrt neigte *F. caeruleum* mit zunehmenden Vortemperaturen zu stärkerer Pathogenität. Die Differenzen zwischen niedrigster und höchster Vortemperatur in der ersten und vierten Wiederholung sind im t-Test signifikant (t = 2,34 bzw. 3,05)[1]). Die Pathogenität von *A. solani* dagegen blieb durchweg von der Vortemperatur unbeeinflußt.

Mit *B. cinerea* wurde eine zweite Versuchsreihe angesetzt, in der ein Viertel der Kulturen zunächst 3 Tage bei 3 bis 4 ° und dann 3 Tage bei 22 bis 23 °C gehalten, ein Viertel der umgekehrten Temperaturfolge ausgesetzt wurde. Ein Viertel wurde 6 Tage bei 3 bis 4 ° und das letzte Viertel bei 22 bis 23 °C aufbewahrt. Die dann vorgenommenen Infektionen an je zehn Knollen ergaben nach 14 Tagen folgendes Bild:

	3—4°C	22—23/3—4°	22—23°	3—4/22—23°
Infektionen	10	10	10	10
Erkrankungen	7	6	2	2
Nekrosentiefe mm..	4,3	3,8	2,5	3,5

Nach Vortemperaturen von 22 bis 23 °C für die ganze Dauer oder in der zweiten Hälfte traten weniger Fäulen auf als nach solchen von 3 bis 4 °C in entsprechender Kombination. Immerhin sind auch im ersten Falle je zwei Knollen befallen worden, im Gegensatz zum ersten Versuch, vermutlich infolge der vorgerückten Jahreszeit (Januar/Februar) und der dadurch bedingten größeren Anfälligkeit der Knollen. Dem unterschiedlichen Infektionserfolg entsprach, wenn auch weniger ausgeprägt, die unterschiedliche Tiefe der Nekrosen. Erfolgte der Wechsel der Vortemperaturen erst nach 14 Tagen und die Infektion am 28. Tage, so waren alle Kulturen einschließlich der 28 Tage bei 3 °C aufbewahrten apathogen. Dieser offensichtliche Einfluß der Vorbehandlungsdauer wurde noch näher analysiert. Wurde der Pilz vor der Infektion 3, 6, 9, 12, 15 bzw. 30 Tage bei 3 bis 4 °C gehalten, so war die Fäule 14 Tage nach der Infektion nach 12- und 15tägiger Vorbehandlung nicht tiefer in die Knolle eingedrungen als nach 3tägiger. Nach Tastversuchen reicht möglicherweise schon eine 12- bis 24stündige Einwirkung von 3 bis 4 °C aus, um dieselbe Pathogenität zu erreichen. Nach 30 Tagen jedoch ging nur noch eine von zehn Infektionen an.

Das in Tabelle 2 dargestellte Wachstum in vitro zeigt bei keinem der drei Pilze eindeutig Beziehungen zur Vortemperatur; im F-Test sind die Unterschiede zwischen den mittleren Myzeltrockengewichten nicht signifikant.

[1]) Überschreitungswahrscheinlichkeit P 5 % = 2,10; P 1 % = 2,98.

Andererseits liegt in beiden Wiederholungen das mittlere Myzeltrockengewicht nach Vortemperatur von 15 °C über (*B. cinerea*) oder unter (*A. solani, F. caeruleum*) den Gewichten nach niedrigen und hohen Vortemperaturen. Auffallend sind die starken Schwankungen der Myzeltrockengewichte bei der tiefen Vortemperatur.

Diskussion

Ein Vergleich der Ergebnisse in Tabellen 1 und 2 zeigt, daß Wachstum und Pathogenität von *F. caeruleum* und *B. cinerea* auf die Vortemperatur verschieden ansprechen. Demnach kann nicht aus der vegetativen Leistung der Pilze auf ihre Pathogenität geschlossen werden. In der Literatur findet sich ein Hinweis von GÄUMANN und NEF (1947), daß die adaptive Pektase, eines der pathogen wirksamen Agenzien von *B. cinerea*, bei Temperaturen zwischen 5 ° und 10 °C am stärksten gebildet wird. Es bleibt zu prüfen, ob das auch nach entsprechenden Vortemperaturen zutrifft. Vielleicht schaffen diese dem Pilz nur mehr oder weniger gute Startbedingungen, wie es die unterschiedliche Pathogenität von *B. cinerea* nach Temperaturwechsel vermuten läßt, während ihr unterschiedlicher Einfluß auf die Pathogenität der drei Pilze auf deren verschiedenartige parasitische Wirkungsmechanismen schließen lassen könnte.

Wenn die Vortemperatur sich während der präinfektionellen Anzucht eines Pilzes auf seine Pathogenität auswirkt, ist damit auch während der Erkrankung des Wirtes zu rechnen. Das erscheint insbesondere bei Pilzen denkbar, die unter ungünstiger Außentemperatur ihre Ausbreitung im Wirt vorübergehend einstellen. Diese Temperatur kann für die Dauer des Wachstumsstillstandes zur Vortemperatur werden. Wie die obigen Ergebnisse zeigen, kann die Pathogenität dadurch geändert werden. Gleichzeitig ändert sich auch die Disposition des Wirtes. So nimmt die Anfälligkeit der Kartoffelknolle mit steigenden Temperaturen geradlinig zu (KRANZ 1959). Bei 25 °C würde demnach *F. caeruleum* mit gesteigerter Pathogenität auf anfälligere Knollen treffen, die andererseits fehlender oder geringer Pathogenität von *B. cinerea* und *P. foveata* ausgesetzt wären.

Zusammenfassung

Im November und Dezember wurde die Pathogenität von *Fusarium caeruleum* nach einer Vortemperatur von 24 °C schwach, diejenige von *Botrytis cinerea* nach einer solchen von 3 °C stark gefördert. Nach Vortemperaturen von 15 ° und 24 °C war *B. cinerea* meist apathogen. Ohne Einfluß blieb die Vortemperatur auf die Pathogenität von *Alternaria solani*. Änderungen der Pathogenität von *B. cinerea* nach Temperaturwechsel scheinen nur bei begrenzter Einwirkungsdauer möglich. Ein gesicherter Einfluß der Vortemperatur auf das Wachstum in vitro ließ sich nicht nachweisen; eine Beziehung zwischen Wachstum und Pathogenität besteht nicht.

Summary

During November and December pathogenicity of *Fusarium caeruleum* on potato tubers was slightly and that of *Botrytis cinerea* markedly increased by pre-temperatures of 24 °C and 3 °C respectively. The latter fungus mostly remained non-pathogenic after pre-temperatures of 15 °C and 24 °C. None of these pre-temperatures affected the pathogenicity of *Alternaria solani*. Alterations of pathogenicity in *Botrytis cinerea* are apparently caused only by limited periods of exposure to 3 °C. A significant influence of pre-temperature on vegetative growth in vitro of the fungi concerned was not to be proved. There is no correlation between vegetative growth and pathogenicity.

Literaturverzeichnis

Folsom, D., 1933: *Botrytis cinerea* as a cause of potato tuber rot. Phytopathology **23**, 993—999.

Gäumann, E., und U. Nef, 1947: Der Einfluß der Temperatur auf die enzymatische Leistungsfähigkeit zweier pflanzenpathogener Pilze. Ber. Schweiz. bot. Ges. **57**, 258—271.

Kranz, J., 1958: Untersuchungen über die *Phoma*-Fäule der Kartoffelknolle unter besonderer Berücksichtigung des Wirt-Parasit-Verhältnisses. Phytopath. Z. **33**, 153—196.

— —, 1959: Einfluß der Vortemperatur auf die Erkrankungsdisposition der Kartoffelknolle für *Phoma foveata* Foister. Nachr.-Bl. dtsch. Pflsch.-Dienst (Braunschweig) **11**, 69—71.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie, Hann. Münden

Einfluß pflanzlicher Virosen auf Stoffwechselfunktionen des Wirtes

III. Mitteilung[1])

P/O-Quotienten und einige Fermentaktivitäten in Knolle, Keim und Blatt viröser Kartoffelpflanzen

Von

H. Boser

Mit 2 Abbildungen

Unsere Versuche (2, 3) an virösen Kartoffelpflanzen werden durch die Bestimmung von P/O-Quotienten und die Ermittlung weiterer Enzymaktivitäten des Zitronensäure- und Pentosephosphatzyklus zu einem gewissen Abschluß gebracht. Außer Knollen und Blättern wurden jetzt auch die Keime gesunder, X-, Y- und blattrollkranker Kartoffeln untersucht. Die Umsatzraten (μ Mole Substrat umgesetzt/Gramm Frischgewicht/Minute) in Homogenaten von Knolle, Blatt und Keim verschiedener Kartoffelsorten werden für folgende Enzyme angegeben: Phosphoglucomutase, Hexokinase, Enolase, G-6-P-Dehydrogenase plus 6-P-Gluconsäure-Dehydrogenase, condensing enzyme, Isozitronensäure-Dehydrogenase und Äpfelsäure-Dehydrogenase.

Material und Methoden. Die Anzucht des Versuchsmaterials erfolgte unter den früher (2, 3) angegebenen Bedingungen. Die Entnahmezeiten sind aus Abbildung 2 ersichtlich. Dunkelkeime wurden durch Lagern der Kronenhälften von Kartoffelknollen in einem Torfbett bei 20 °C und etwa 80 % Luftfeuchtigkeit gewonnen.

Die Gewinnung der Enzymlösungen erfolgte für Blätter und Knollen nach (3). Homogenate der Keime wurden durch Verreiben mit etwas reinem Quarzsand in vorgekühlten Porzellanmörsern erhalten.

Zur Stabilisierung der Enzyme wurde während des Homogenisierens in allen Fällen Cystein zugegeben (Endkonzentration 0,01 molar).

Bestimmung der Enzymaktivitäten. Phosphoglucomutase, Hexokinase, Enolase und Äpfelsäure-Dehydrogenase wie in (3).

[1]) Teilweise vorgetragen auf dem IV. Internationalen Kongreß für Biochemie in Wien 1958 (1).

G-6-P-Dehydrogenase plus 6-P-Gluconsäuredehydrogenase nach (4).
condensing enzyme nach (12).
Isocitrico-Dehydrogenase nach (9).

Eine Präinkubationszeit (vgl. Tab. 2 in [3]), die zur Gleichgewichtseinstellung (Verbrauch des im Homogenat vorhandenen Substratvorrates) nötig ist, wurde bei allen Testungen beachtet.

Atmung. 200 mg Gewebsschnitt (0,1 mm Dicke bei Knolle und Keim; Blätter lediglich in 5 × 5 mm Areale zerschnitten) wurden in dem Gemisch nach Martius und Hess (8) im Warburg-Apparat inkubiert. Die Berechnung des Sauerstoffverbrauches (μ Atome O/g Frischgewicht/Minute) geschah durch Interpolation; die Atmungskurve verläuft über mindestens 3 Stunden linear. Eine Korrektur der CO_2-Bindung durch das Inkubationsgemisch wurde vorgenommen.

Zusammensetzung des Gemisches: In 2,5 ml Gesamtvolumen/Kölbchen befanden sich (μ Mole) 16,5 $MgCl_2$, 62,5 KCl, 25 β-oxybuttersaures Natrium, 2,5 Adenosintriphosphat, 0,025 Cytochrom c, 1,25 Diphosphopyridin-Nukleotid, 62,5 KF, 50 Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 65 Glukose und 0,1 ml Hexokinase.

Im Gegensatz zu unseren früheren Versuchen (2), die bei einer Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte, ergibt sich jetzt auch für X- und blattrollkranke Organe eine erhöhte Atmung.

P/O-Quotienten. Die Bestimmung erfolgte nach der Hexokinasemethode von Martius und Hess (8). Je 500 mg Gewebsschnitte wurden in Reagenzgläser eingewogen. Zum Zeitpunkt Null geschah die Aufgabe von 1 ml Inkubationslösung (Zusammensetzung wie bei den Atmungsversuchen). Nach 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 8%iger Trichloressigsäure gestoppt und die Aufnahme des anorganischen Phosphates nach (7) bestimmt. Die Phosphataufnahme erfolgte nur bis etwa 8 Sek. linear, die Umsatzrate (μ Atome P/g Frischgewicht/Minute) wurde durch Extrapolation ermittelt.

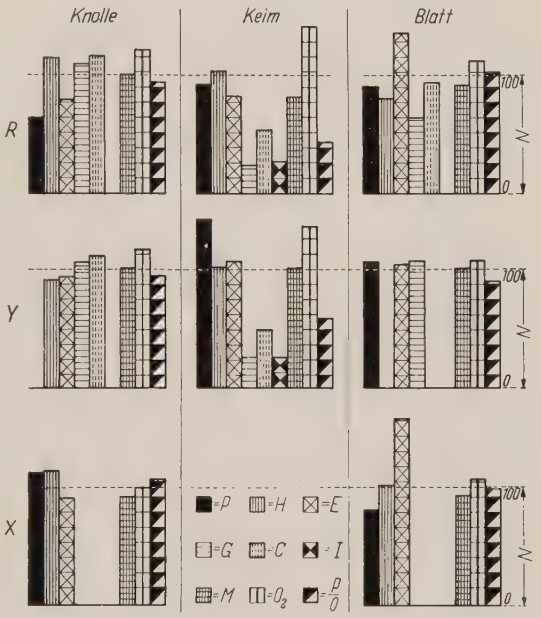


Abb. 1. Relative Aktivitäten (jede Säule bezogen auf die Aktivität im gesunden Organ = 100) in Knolle, Keim und Blatt blattroll- (R), Y- und X-viroser Kartoffelpflanzen. Absolutwerte vgl. Tabelle 1. P = Phosphoglucomutase; H = Hexokinase; E = Enolase; G = Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; C = condensing enzyme; I = Isocitrico-Dehydrogenase; M = Äpfelsäuredehygenase; O_2 = Atmung; P/O = P/O-Quotient; N = Aktivität des gesunden Organes (= 100 wird durch die Querlinien markiert)

Ergebnisse und Diskussion

Seit unseren ersten Arbeiten (2, 3) sind eine Reihe von Publikationen über die Biochemie der Pflanzenvirusinfektion erschienen, eine aktuelle Übersicht gibt Porter (11). Abgesehen von einer Atmungssteigerung in der Initialphase der Virusinfektion wird der Stoffwechsel der Wirtspflanze im all-

gemeinen nur wenig beeinflußt. Auch an anderen Objekten (z. B. *E. coli* nach Infektion mit T-Phagen [10, 6]) wurden trotz intensiver Untersuchungen kaum Stoffwechselabnormitäten gefunden. Aus unseren jetzt vorgelegten Befunden ergibt sich, daß die oberirdischen Teile auch völlig zusammengebrochener Kulturen — erfaßt wurde das Spätstadium nach Sekundärinfektion — in ihren Funktionen (Dunkelstoffwechsel in vitro) der Glykolyse, des Zitronensäure- und Pentosephosphatzyklus sowie der oxydativen Phosphorylierung kaum von den Normalwerten gesunder Pflanzen abweichen (Abb. 1). Dasselbe gilt für die Knollen dieser Pflanzen. Einer in virösen Blättern und Knollen generell nachweisbaren Steigerung der Atmung entspricht auch eine erhöhte Phosphorylierung (Abb. 1); eine „Entkopplung" der Atmungskettenphosphorylierung liegt demnach nicht vor. Es sei jedoch auf die in Abbildung 1 angegebenen starken Stoffwechseldekompositionen junger viröser Kartoffelkeime verwiesen. Die in Abbildung 1 wiedergegebenen Relationen gelten für vier Wochen alte Dunkelkeime. Wie Abbildung 2 zeigt, tritt mit zunehmendem Alter des rollkranken Keimes eine Normalisierung der G-6-P-Dehydrogenaseaktivität ein. Wir haben gefunden, daß diese Normalisierung generell für alle untersuchten Enzymaktivitäten gilt, auch die Atmung und die P/O-Quotienten sind in drei bis vier Monate alten virösen Keimen wieder auf dem normalen Status.

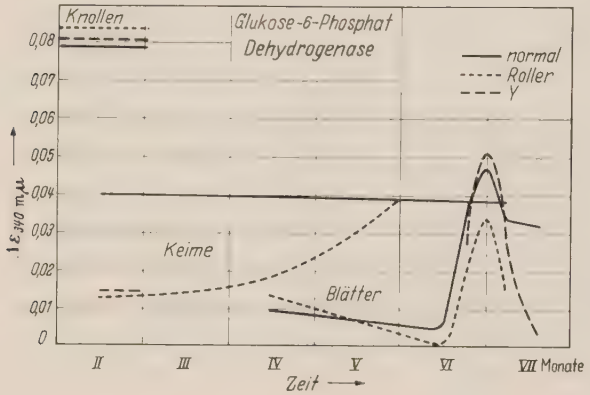


Abb. 2. Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ($\Delta E_{340\ m\mu}$/100 mg Frischgewicht/Minute) in Homogenaten lagernder Knollen, wachsender Dunkelkeime und feldfrischer Blätter gesunder, blattroll- und Y-viroser Kartoffelpflanzen. Zeit Januar bis Juli 1958. Die Werte für Blätter beziehen sich (wegen Verdünnung mit Pufferlösung beim Homogenisieren) auf 50 mg Frischgewicht

Außerdem zeigt Abbildung 2, daß die Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase in Knolle und Keim über Monate konstant ist, während die jahreszeitlichen Schwankungen im Blatt beträchtlich sind. Für die Enzymaktivitäten in Blättern können daher in Tabelle 1 nur Grenzwerte angegeben werden.

Bewußt haben wir Enzyme gewählt, die entweder „Schrittmacherreaktionen" (5) beherrschen (z. B. Hexokinase) oder an Punkten möglicher Stoffwechselverzweigungen (5) liegen (Pentosephosphatzyklus als Möglichkeit der Direktoxydation von G-6-P). Soweit aus Abbildung 1 ablesbar, ist die Bevorzugung des einen oder anderen Stoffwechsel-Alternativweges im virösen Organ nicht gegeben. Über Glykolyse und Atmungskettenphosphorylierung wird bekanntlich der allergrößte Teil der zur Erhaltung der Zelle nötigen Energie gewonnen. Da diese Vorgänge in virösen Pflanzenorganen praktisch normal

Tabelle 1

Umsatzraten

(μ Mole vorgelegtes Substrat umgesetzt/Gramm Frischgewicht/Minute) einiger Enzyme aus Homogenaten gesunder Knollen, Keime und Blätter verschiedener Kartoffelsorten

Enzym	Sorte	Knolle	Keim	Blatt
G-6-P-Dehydrogenase	Ackersegen	0,0376 ± 0,003	0,0188 ± 0,003	0,027 bis 0,043
Äpfelsäure-Dehydrogenase	Ackersegen	—	11,3 ± 0,64	12,6 bis 19,0
	Adelheid	10,5 ± 0,62	—	15,8 bis 19,0
	Vertifolia	7,7 ± 0,36	—	12,2 bis 19,0
Isocitrico-Dehydrogenase	Ackersegen	0,0048 ± 0,0006	0,0169 ± 0,0025	—
condensing-enzyme	Ackersegen	0,0169 ± 0,002	0,0294 ± 0,005	—
	Ancilla	—	—	0,015 bis 0,026
	Voran	—	—	0,015 bis 0,026
Enolase	Ackersegen	0,683 ± 0,03	0,179 ± 0,013	—
	Adelheid	1.76 ± 0,09	—	1,26 bis 1,4
	Vertifolia	1,44 ± 0,06	0,403 ± 0,044	0,62 bis 1,1
Hexokinase	Ackersegen	1,79 ± 0,11	2,10 ± 0,15	—
	Adelheid	1,87 ± 0,15	—	0,19 bis 0,80
	Vertifolia	2,30 ± 0,18	2,15 ± 0,15	0,36 bis 0,90
Phosphoglucomutase	Ackersegen	0,0185	0,28 ± 0,02	—
	Adelheid	—	—	0,24 bis 0,39
	Vertifolia	0,0278 ± 0,0015	0,428 ± 0,04	0,27 bis 0,42
Atmung*)	Ackersegen	0,102 ± 0,0069	0,252 ± 0,011	1,09 ± 0,091
	Vertifolia	0,15 ± 0,009	—	1,14 ± 0,071

*) Sauerstoffaufnahme (μ Atome O/Gramm Frischgewicht/Minute) von Schnittpräparaten.

ablaufen, sind weitere Untersuchungen nötig, um endlich zu erfahren, wo die doch so augenfällige Schädigung des virusinfizierten Organismus entscheidend ihren Ausgang nimmt.

Für vergleichende Untersuchungen könnten die in Tabelle 1 für sieben Enzyme angegebenen Umsatzzahlen (μ Mole Substrat umgesetzt/g Frischgewicht/Minute) von Interesse sein. Auch scheint es bemerkenswert, daß die Enzymausrüstung des Blattes — als hochaktives Stoffwechselorgan — die Aktivitäten gleicher Frischgewichtsmengen von Knolle oder Keim kaum erreichen.

Zusammenfassung

1. Die Umsatzzahlen (μ Mole Substrat umgesetzt/g Frischgewicht/Minute) folgender Enzyme in Homogenaten von Knolle, Blatt und Keim verschiedener Kartoffelsorten werden angegeben: Phosphoglucomutase, Hexokinase, Enolase, G-6-P-Dehydrogenase plus 6-P-Gluconsäure-Dehydrogenase, condensing enzyme, Isozitronensäure-Dehydrogenase und Äpfelsäure-Dehydrogenase.

2. Die Atmung und die P/O-Quotienten von Schnittpräparaten aus Knolle, Blatt und Keim gesunder Pflanzen wurden bestimmt.

3. Die unter 1 und 2 genannten Funktionen wurden vergleichend in den Organen viröser (X-, Y- und blattrollkranker) Kartoffelpflanzen bestimmt.

4. Die genannten Stoffwechselfunktionen sind in den oberirdischen Teilen sekundärinfizierter Kartoffelpflanzen relativ normal, ebenso in den Knollen.

5. Junge Dunkelkeime viröser Knollen zeigen starke Stoffwechseldekompensationen, die sich mit zunehmendem Keimalter normalisieren.

6. Die Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase in Knolle, Keim und Blatt wird über eine Vegetationsperiode verfolgt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung der Arbeit.

Summary

Influence of plant viruses on metabolic functions of the host

1. The conversion figure (μ Moles substrate converted/g fresh weight/minute) are given for the following enzymes in homogenates of tubers, leaf and sprout in different potato varieties: phosphoglucomutase, hexokinase, enolase, G-6-P-dehydrogenase plus G-6-P-gluconic-acid dehydrogenase, condensing enzyme, isocitric-acid dehydrogenase and malic-acid dehydrogenase.

2. The respiration and P/O quotients of cut preparations of tubers, leaves and sprouts of healthy plants were determined.

3. The functions mentioned in 1 and 2 were determined for comparison in the organs of virus-infected potato plants (X, Y and leaf roll viruses).

4. The above metabolic functions are relatively normal in the above-ground portions of secondarily infected potato plants and also in the tubers.

5. Young sprouts from virus infected tubers grown in the dark show marked metabolic decompensations, which gradually become normal with increasing age of the sprout.

6. The activity of G-6-P-dehydrogenase was followed in tubers, sprouts and leaves during a whole vegetation period.

Literaturverzeichnis

1. BOSER, H., 1958: Stoffwechseluntersuchungen in vitro an Geweben viruskranker Pflanzen. Suppl. Internat. Abstr. Biol. Sciences 11—10. Pergamon Press, London, New York, Paris, Los Angeles.

2. — —, 1957: Einfluß pflanzlicher Virosen auf Stoffwechselfunktionen des Wirtes. I. Mitteilung. Glycolyse und Atmung gesunder und roll-, strichel- und mosaikkranker Kartoffeln. Biochem. Z. **328**, 458—464.

3. — —, 1958: Einfluß pflanzlicher Virosen auf Stoffwechselfunktionen des Wirtes. II. Mitteilung. Aktivitäten einiger Fermente des Glycolysesystems und des Citronensäurecyclus in gesunden und virösen Kartoffelblättern und -knollen. Phytopath. Z. **33**, 197—202.

4. Kornberg, A., and B. L. Horecker, 1955: Methods in Enzymology I. Acad. Press New York, S. 323.

5. Krebs, H. A., H. L. Kornberg and K. Burton, 1957: Energy Transformations in Living Matter. A Survay. Ergebn. Physiol., Biol. Chem. und exper. Pharmakol. **49**, 212—298.

6. Levy, H. B., and S. Baron, 1956: Some Metabolitic Effects of Poliomyelitis Virus on Tissue Culture. Nature (London) **178**, 1230—1231.

7. Lohmann, K., und L. Jendrassik, 1926: Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmungen im Muskelextrakt. Biochem. Z. **178**, 419—426.

8. Martius, C., und B. Hess, 1955: Über den Wirkungsmechanismus des Schilddrüsenhormons. Biochem. Z. **326**, 191—203.

9. Ochoa, S., 1948: Biosynthesis of Tricarboxylic Acids by Carbondioxyde Fixation III. Enzymatic Mechanisms. J. Biol. Chem. **174**, 133—157.

10. Pardee, A. B., and R. E. Kunkee, 1952: Enzyme Activity and Bacterophage Infection II. Activities before and after Virus Infection. J. Biol. Chem. **199**, 9—24.

11. Porter, C. A., 1959: Biochemistry of Plant Virus Infection. Advanc. Virus Res. **6**, 75—91.

12. Stern, J. R., S. Ochoa and F. Lynen, 1952: Enzymatic Synthesis of Citric Acid V. Reaction of Acetyl Coenzyme A. J. Biol. Chem. **198**, 313—321.

Aus der Biologischen Zentralanstalt der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Phytopathologie Aschersleben
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Untersuchungen über Virosen des Kernobstes

I. Das Apfelmosaikvirus[1])

Von

H. Kegler

Mit 10 Abbildungen

Inhalt: 1. Material und Methoden — 2. Verbreitung in der DDR und wirtschaftliche Bedeutung — 3. Symptomatologie — 4. Anfälligkeit verschiedener Sorten und *Malus*-Formen — 5. Übertragung — 6. Wärmetherapie — Diskussion — Zusammenfassung — Summary — Literaturverzeichnis

Die Krankheitserscheinungen des Apfelmosaiks sind bereits seit über 125 Jahren bekannt. Vermutlich erfolgte die erste Übertragung dieser „Blattveränderungen" vom Reis auf die Unterlage bereits 1825 durch Noisette, mit Sicherheit jedoch 1863 durch Vibert (zit. nach Bradford und Joley 1933). Der endgültige Nachweis, daß es sich um eine Viruskrankheit handelt, wurde durch Pfropfübertragung von Orton und Wood (1924) sowie nach Übertragung durch Okulation von Christoff (1934) erbracht. Das Vorkommen dieser Virose ist heute in Europa aus Bulgarien (Christoff 1934), Finnland (Jamalainen 1957), Frankreich (Morvan 1957), Großbritannien (Wallace, Ogilvie und Swarbrick 1944), Holland (van Katwijk 1953), Italien (Foschi 1951), Norwegen (Ramsfjell 1950), Schweden (Lihnell 1949), aus der Schweiz (Blumer 1955) und der Sowjetunion (Peterson 1956) bekannt. Ferner fand man das Apfelmosaik in Australien (Atkinson und Chamberlain 1948, Harvey 1957), Indien (Vasudeva 1958) und Nordamerika (Thomas 1937). In Mitteldeutschland wurde es durch Baumann und Klinkowski (1955) nachgewiesen.

[1]) Auszug aus der Dissertation „Beiträge zur Kenntnis der Kernobstvirosen", vorgelegt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1959.

1. Material und Methoden

Die Angaben über die Verbreitung des Apfelmosaiks stützen sich auf eigene Funde oder Mitteilungen durch Obstbauern oder Pflanzenschutzwarte. Im letzteren Falle fand stets eine Überprüfung statt. Zweifelsfälle blieben unberücksichtigt.

Die Prüfung von Apfelsorten auf ihre Anfälligkeit gegenüber dem Apfelmosaikvirus wurde im Frühjahr 1957 begonnen. Als Infektionsmaterial dienten Reiser eines völlig verseuchten Baumes der Sorte „Lady Sudeley" (Abb. 1). Die Reiser entstammten dem Sortiment der Versuchsstation Großottersleben des Instituts für Gartenbau Dresden/Pillnitz der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin[1]). Das Sortiment wurde 1956 symptomatologisch auf Virusbefall überprüft, und die kranken Bäume wurden von der Reisergewinnung ausgeschlossen. Wir pfropften jeweils zwei Reiser einer Sorte auf M XI-Unterlagen. Zwischen Unterlage und dem zu prüfenden Reis fügten wir ein zwei bis drei Knospen tragendes krankes Reisstück ein (Doppelpfropfung). Bei Anwendung dieser Methode sind noch im gleichen Jahre Symptome zu erwarten. Es wurde stets hinter die Rinde gepfropft.

Abb. 1. Apfelmosaik an „Lady Sudeley". Von diesem Baum (Fundort: Magdeburg) stammte das in allen Versuchen verwandte Infektionsmaterial

Im Frühjahr 1958 wurden je zwei Reiser einer Sorte sowie verschiedene *Malus*-Formen auf einen stark befallenen Baum der Sorte „Lady Sudeley" gepfropft. Die *Malus*-Formen stammten aus dem Sortiment der Biologischen Zentralanstalt der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Phytopathologie Naumburg[2]). Die beiden Bäume der Sorte „Lady Sudeley" befinden sich in der Forschungsstation des Lehr- und Versuchsgutes Schraderhof/Magdeburg des Instituts für Obst- und Gemüsebau der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg[3]). Infolge der Kürze der Beobachtungszeit sind nur begrenzt gültige Aussagen über die Anfälligkeit möglich. In den Fällen, in denen keine Symptome sichtbar wurden, steht der Nachweis einer möglichen Latenz noch aus. Kontrollpfropfungen aller Sorten und *Malus*-Formen wurden auf gesunde M IX-Unterlagen vorgenommen, da keine gesunden Bäume bzw. Reiser der Sorte „Lady Sudeley" zur Verfügung standen.

Die Versuche zur Übertragung des Apfelmosaikvirus auf Sorten oder Sämlinge fanden durch Pfropfung, Okulation und Rindenpfropfung (chip budding) statt und wurden in den Monaten April und Mai (Pfropfung) bzw. Anfang August (Okulation) durchgeführt.

Die Versuche zur mechanischen Übertragung auf krautige Pflanzen wurden in den Monaten Februar bis Mai der Jahre 1956, 1957 und 1958 in unterschiedlicher Versuchsanstellung vorgenommen. Hierbei wurde zunächst die Methode der Abreibung frisch gewonnener, 1 : 1 mit Pufferlösungen verdünnter Preßsäfte angewandt. Als Puffer dienten Na_2SO_3 sowie Phosphatpufferlösungen nach Sörensen mit unterschiedlichen pH-Werten. Später wurde das Verfahren modifiziert: 1. Die Testpflanzen wurden vor der Abreibung bestimmte Zeit dunkel gestellt. 2. Die Abreibung fand bei unterschiedlichen Raumtemperaturen statt. 3. Statt des Preßsaftes wurden in Anlehnung an Versuche von Yarwood (1953,

[1]) Herrn Schossig habe ich für sein Entgegenkommen und die Unterstützung dieser Arbeiten zu danken.

[2]) Fräulein Mildenberger danke ich für die zur Verfügung gestellten *Malus*- und *Pirus*-Reiser.

[3]) Herr Dr. Funk stellte mir die Bäume zur Verfügung, wofür ich ihm vielmals danke.

1955, 1957) frisch geschnittene Wundflächen von Blättern viruskranker Apfelsämlinge auf mit Puffer benetzte und mit Karborund bestäubte Testpflanzen gerieben. 4. Nach der Exsudatmethode von JOHNSON (1951) wurden Säfte gewonnen und unverdünnt mit der Fingerkuppe auf Testpflanzen verrieben. Bei jedem Versuch wurden 10 Pflanzen mit virushaltigem, 10 weitere als Kontrolle mit gesundem Material inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Pflanzen 6 bis 8 Wochen beobachtet.

Die wärmetherapeutischen Versuche an mosaikkranken Apfelreisern begannen 1957 und wurden 1958 und 1959 fortgesetzt. Die zur Behandlung vorgesehenen Reiser wurden im Dezember geschnitten und an einer geschützten Stelle im Freien in Kies eingeschlagen. Nach der im Februar stattgefundenen Behandlung wurden sie auf Sämlinge gepfropft, die im Gewächshaus vorgetrieben worden waren. Dabei fand die Doppelpfropfung Anwendung, indem auf den Sämling das behandelte Reis und auf dieses ein Reisstück der Indikatorsorte „Komsomolez" gepfropft wurde (Abb. 2 und 3). Hierdurch war ein Virusnachweis auch bei Maskierung möglich. Die Versuche erfolgten sowohl in Form der Warmwasserbehandlung im Wasserbade eines Höppler-Thermostaten mit einer Temperaturkonstanz von ± 0,2 °C als auch der Warmluftbehandlung im Trockenschrank mit einer Temperaturkonstanz von ± 1 °C. Hierbei wurden die Schnittflächen der Reiser vor der Behandlung mit Siegellack verstrichen, der sich nach Abkühlung wieder leicht lösen ließ. Auf die sonst übliche Anwendung von Paraffin wurde verzichtet, da durch die hohen Temperaturen ein Schmelzen des Paraffins befürchtet wurde. Die Abkühlung erfolgte unmittelbar nach der Behandlung unter fließendem Wasser von etwa 12 bis 14 °C. Von jedem Reis wurde ein Teilstück behandelt, ein zweites diente als Kontrolle und wurde in gleicher Weise gepfropft. Vor der Pfropfung einer jeden Serie wurde das Pfropfbesteck in Seifenwasser gereinigt. Es wurden nur die basalen und mittleren Teile der Triebe verwandt, da nach POSNETTE und CROPLEY (1956) die apikalen Enden der Triebe häufig virusfrei sind.

Abb. 2. Doppelpfropfung zum Virusnachweis beim Apfel. „Komsomolez" (Indikator) und „Lady Sudeley" (Virusspender) auf Apfelsämling.
Pfropfung: 12. 3. 1958; Aufnahme: 27. 5. 1958

Zur Messung der Temperaturen in den Reisern wurde ein für diesen Zweck angefertigtes, in eine Impfkanüle eingeführtes Thermoelement verwandt, das von einem Akkumulator gespeist wurde und an ein Spiegelgalvanometer angeschlossen war. Ein zweites Thermoelement befand sich freihängend neben dem Reis im Trockenschrank bzw. im Wasser des Thermostaten. Beide Thermoelemente waren verbunden, so daß die zwischen ihnen bestehende Temperaturdifferenz gemessen werden konnte. Das in die Impfkanüle eingebaute Thermoelement wurde 1 bis 2 cm hinter die Rinde oder in die Reisachse der 4 bis 7 mm dicken Reiser der Apfelsorte „Ontario" gesteckt. Die Veränderung der Temperaturdifferenz wurde mit einer Stoppuhr nach Beginn der Behandlung in regelmäßigen Abständen an dem geeichten Galvanometer abgelesen[1]).

[1]) Herrn Dr. W. PAWLITSCHEK danke ich für Hinweise bei der Durchführung dieser Versuche.

Abb. 3. Mosaiksymptome auf „Komsomolez" nach Doppelpfropfung mit krankem Reis von „Lady Sudeley". Rechts „Lady Sudeley" ohne Indikator; es treten noch keine Symptome auf. Pfropfung: 12. 3. 1958; Aufnahme: 27. 5. 1958

2. Verbreitung in der DDR und wirtschaftliche Bedeutung

Das Apfelmosaik tritt im Gebiet der DDR nur sporadisch auf und hat seiner geringen Verbreitung wegen keine nennenswerte wirtschaftliche Bedeutung. Es wurde bisher an folgenden Sorten festgestellt: „Alexander", „Boskoop", „Cox", „Croncels", „Gascoynes Scharlachroter", „Grahams Jubiläumsapfel", „Grüner Stettiner", „Hammerstein", „Jonathan", „Lady Sudeley", „Landsberger", „Mein Liebling", „M I", „Nordhausen" und „Roter Astrachan".

Das Apfelmosaik führt an befallenen Bäumen zu beträchtlichen Schäden. Es kann nach Untersuchungen von Posnette und Cropley (1956, 1959) Verluste hervorrufen, die an bestimmten Sorten 40 % („Allington Pippin") bzw. 30 % („Cox Orange Pippin") der möglichen Ernte betragen. Trieb- und Dickenwachstum der Bäume können um 20 % vermindert sein.

3. Symptomatologie

Die Krankheitserscheinungen des Apfelmosaiks treten in der Regel deutlich und in großer Mannigfaltigkeit auf. Sie können von schwacher hellgrüner Fleckung der Blattspreite über die Ausbildung leuchtend gelber Ringe, Bänder oder Flecke bis zur vollständigen Vergilbung der Blattspreite variieren. Als Ursache dieser Variabilität werden das Vorhandensein verschiedener Virusstämme sowie die unterschiedliche Anfälligkeit der Sorten angesehen. Den ersten Nachweis über das Vorkommen mehrerer Stämme des Apfelmosaikvirus lieferten Posnette und Cropley (1952, 1956). Unterschiedliche Symptomausbildung auf bestimmten Apfelsorten und Unterlagen ermöglichte

Abb. 4. Symptombilder verschiedener Apfelsämlinge, die mit dem gleichen Virusstamm infiziert wurden. Links oben schwache hellgrüne Sprenkelung

eine Differenzierung von Stämmen, die sie als „severe mosaic", „mild veinbanding" und „mild mosaic" bezeichneten. Es sei bemerkt, daß die gleiche Variation der Symptomausbildung bei gleichem Virusstamm aber genetisch verschiedenen Wirten möglich ist. Die Krankheitserscheinungen der Blätter von Apfelsämlingen variieren von kaum erkennbarer hellgrüner Blattschekkung bis zur fleckenartigen, bandartigen oder teilweisen Vergilbung (Abb. 4). Die Sämlinge („James Grieve", frei abgeblüht) wurden durch Rindenpfropfung von einem kranken Reis der Sorte „Lady Sudeley" infiziert. Mit der gleichen Virusherkunft wurden M IV-Unterlagen infiziert, die mit weitgehend einheitlichen Symptomen reagierten (Abb. 5).

4. Anfälligkeit verschiedener Sorten und *Malus*-Formen[1])

Unterschiedliche Sortenreaktion nach Infektion durch das Apfelmosaikvirus konnten bereits BRADFORD und JOLEY (1933) sowie POSNETTE und CROPLEY (1956) feststellen. Die Anfälligkeit einer Sorte kann symptomatologisch und durch veränderte Ertragsfähigkeit zum Ausdruck kommen. Symptomatologisch äußert sich die Anfälligkeit in folgenden Erscheinungen:

1. Inkubationszeit,
2. Anteil der Symptome aufweisenden Blätter und
3. Stärke der Symptomausbildung.

Nach diesen Gesichtspunkten sind die geprüften Sorten in Tabelle 1 zusammengestellt (siehe auch Abb. 6). Dabei zeigt sich, daß die

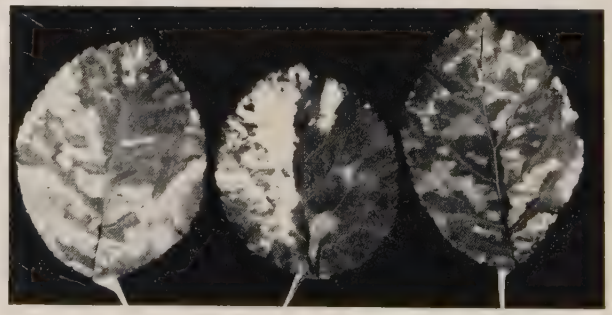


Abb. 5. Apfelmosaik an M IV-Unterlagen. Gelbfleckung und teilweise Vergilbung der Blattspreiten aller Blätter

[1]) Da es häufig unsicher ist, ob es sich um Arten oder Bastarde handelt, wurde der Begriff „Form" verwendet.

Verzögerung des Auftretens der Symptome in der Regel mit schwächerer Symptomausbildung und geringerem Anteil geschädigter Blätter verbunden ist. Aus dieser Beziehung läßt sich ein „Anfälligkeitswert" (AW) bestimmen, der sich aus dem Produkt des Anteils geschädigter Blätter (A) mit dem Schädigungsgrad (S), dividiert durch die Inkubationszeit (I), ergibt:

$$AW = \frac{A \cdot S}{I}$$

Dieser „Anfälligkeitswert" dient nur zum Vergleich der verschiedenen Sorten und Formen und hat für andere Virosen keine Gültigkeit.

Die tabellarische Übersicht läßt eine ausreichende Übereinstimmung der zur Charakterisierung der Anfälligkeit herangezogenen Daten erkennen. Zwischen den Sorten der Gruppen I und III bestehen beträchtliche Unterschiede, die in der Regel deutlich bei der Inkubationszeit hervortreten. Während „Elisabethapfel" und „Komsomolez" bereits nach 3 Wochen starke Gelbfleckung zeigten, traten bei „Bellefleur Rekord" und „Weißer Astrachan" die ersten schwachen Symptome nach einem Vierteljahr, also Mitte August, auf.

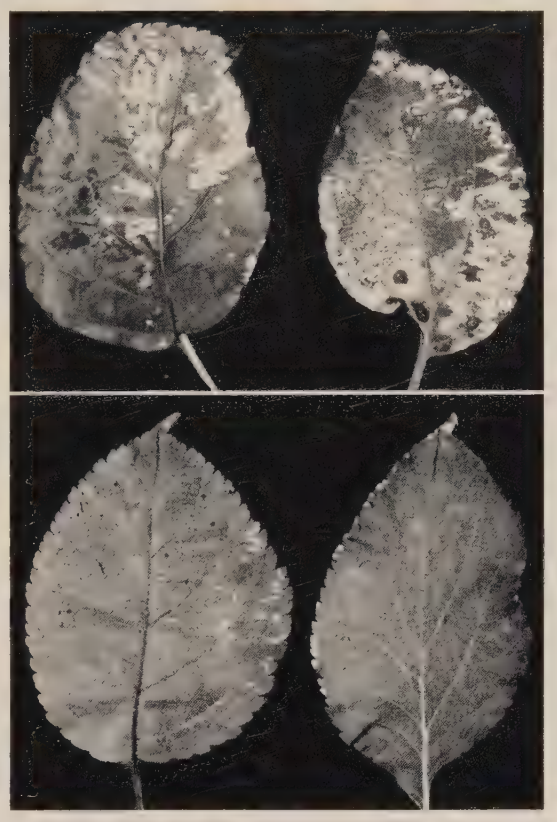


Abb. 6. Anfälligkeit verschiedener Apfelsorten gegenüber dem Apfelmosaikvirus. Oben „Elisabethapfel" (links) und „Rebristoje" mit hoher Anfälligkeit; unten „Bellefleur Rekord" (links) und „Renet Bergamotnij" mit schwacher Anfälligkeit

Die große Variabilität der Anfälligkeit gegenüber dem Apfelmosaikvirus bei Apfelsämlingen und -sorten ließ ähnliche Unterschiede auch beim Vergleich verschiedener *Malus*-Formen vermuten. Von den in gleicher Weise wie die Apfelsorten gepfropften 36 *Malus*-Formen fand nur in 17 Fällen eine Verwachsung mit nachfolgendem kräftigen Austrieb statt. Der relativ geringe Verwachsungserfolg kann zum Teil auf Unverträglichkeit einzelner Formen mit der Unterlage beruhen. Die zur gleichen Zeit gepfropften Edelsorten wuchsen ausnahmslos an. Tabelle 2 und Abbildung 7 geben die unterschiedliche Anfälligkeit der geprüften *Malus*-Formen wieder.

Eine gewisse Übereinstimmung der drei zur Klassifizierung herangezogenen Charakteristika war auch bei den *Malus*-Formen zu erkennen, obwohl

Tabelle 1

Anfälligkeit verschiedener Apfelsorten gegenüber dem Apfelmosaikvirus

(Pfropfung 6. Mai 1958)

Sorte	Inkubationszeit in Wochen	Anteil geschädigter Blätter in %	Schädigungsgrad der Blätter*)	Anfälligkeitswert
I. Hohe Anfälligkeit				
Champagnerrenette	5	70	3	42,0
Elisabethapfel	3	73	3	73,0
Komsomolez	3	87	3	87,0
Rebristoje	4	75	3	56,3
II. Mittlere Anfälligkeit				
Gascoynes Scharlachroter	10	58	2	11,6
Jacob Lebel	6	62	2	20,7
James Grieve	7	58	2	16,6
III. Schwache Anfälligkeit				
Antonowka	6	31	1	5,2
Bellefleur Rekord	14	12	1	0,9
Dülmener Rosenapfel	7	12	1	1,7
Herrenhut	10	11	1	1,1
Renet Bergamotnij	10	18	1	1,8
Weißer Astrachan	13	7	1	0,5

*) 1 = schwach (vereinzelte, hellgrüne oder gelbe Flecke),
2 = mittel (vereinzelte, größere gelbe Flecke oder Bänder),
3 = stark (Gelbfleckung oder Vergilbung eines Teiles der Blattspreite).

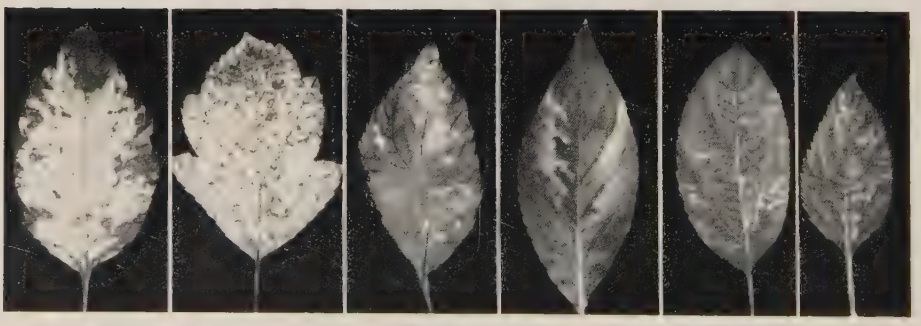


Abb. 7. Anfälligkeit von *Malus*-Formen gegenüber dem Apfelmosaikvirus. Links *M. floribunda* Sieb. und *M. ioensis* (Wood.) Brit. mit hoher Anfälligkeit; Mitte *M. purpurea* Rhed. und *M. pumila apetala Schneid.* mit mittlerer Anfälligkeit; Rechts *M. odorata* Hort. und *M. angustifolia* (Ait.) Michx. mit schwacher Anfälligkeit

Überschneidungen zwischen den einzelnen Gruppen häufiger vorkommen als bei den Edelsorten. So zeigte z. B. *Malus floribunda arnoldiana* Rehd. nur schwache Symptome, die spät, aber an relativ vielen Blättern auftraten. Bei den symptomlos gebliebenen *Malus*-Formen blieb noch ungeklärt, ob es sich

Tabelle 2

Anfälligkeit verschiedener *Malus*-Formen gegenüber dem Apfelmosaikvirus

(Pfropfung 6. Mai 1958)

Malus-Form	Inkubationszeit in Wochen	Anteil geschädigter Blätter in %	Schädigungsgrad der Blätter	Anfälligkeitswert
I. Hohe Anfälligkeit				
floribunda Sieb.*)	—	—	3	—
ioensis (Wood) Brit.	3	66	3	66,0
lancifolia Rehd.	4	71	3	53,2
II. Mittlere Anfälligkeit				
atrosanguinea Schneid.	7	31	1—2	6,6
floribunda arnoldiana Rehd.	8—9	85	1—2	14,1—15,1
pumila apetala Schneid.	8	14	2	3,5
pumila pendula Schneid.	7	27	1—2	5,7
pumila plena	7	27	1—2	5,7
purpurea Rehd.*)	—	—	2	—
ortocarpa Lavall	9	27	1—2	4,4
III. Schwache Anfälligkeit				
adstringens Zabel	8	10	1	1,2
angustifolia (Ait.) Michx.	8	11	1	1,4
baccata Borkh. *fructuflavo*	8	14	1	1,7
cerasifera Spach.	8	6	1	0,7
micromalus Mak.	11	8	1	0,7
odorata Hort.	9	16	1—2	2,7
sikkimensis Koehne*)	—	—	1	—
yunanensis Schneid.*)	—	—	1	—
IV. Symptomlos				
fusca (Raf.) Schneid.	—	—	—	—
robusta Rehd.	—	—	—	—
sargentii Rehd.*)	—	—	—	—
toringoides Hughes	—	—	—	—

*) Diese *Malus*-Formen wurden 1955 von Dr. G. Baumann, Aschersleben, im Versuchsfeld des Institutes angepflanzt und am 1. August 1955 mit Knospen derselben Bäume okuliert, die später auch als Virusspender der anderen *Malus*-Formen dienten. In den Jahren 1956, 1957 und 1958 wurden *Malus sargentii* Rehd., *M. floribunda* Sieb., *M. sikkimensis* Koehne und *M. yunanensis* Schneid. nochmals okuliert.

Abb. 8. Mosaiksymptome an „Komsomolez" 4 Wochen nach Pfropfung auf mosaikkrankem *Malus floribunda* Sieb. im Freiland. Pfropfung: 1. 5. 1958; Aufnahme: 27. 5. 1958

hierbei um Latenz oder Immunität handelte. Die in Tabelle 2 mit *) gekennzeichneten Formen wurden 1958 mit Reisern der Indikatorsorte „Komsomolez" gepfropft. Während bei den anfälligen, Symptome zeigenden Formen „Komsomolez" deutliche Flecke aufwies (Abbild. 8), blieb diese Sorte bei *Malus fusca* (Raf.) Schneid. und *M. sargentii* Rehd. symptomlos. Da die in den Vorjahren okulierten Knospen bei beiden Formen nicht anwuchsen, ist ungewiß, ob das Virus in den Wirt gelangte. Zur Klärung dieses Befundes ist Doppelpfropfung von Reisern der symptomlos gebliebenen Formen mit Indikatorreisern auf kranken Unterlagen vorgesehen.

5. Übertragung

Während die ersten Übertragungen des Apfelmosaikvirus durch Pfropfung oder Okulation bereits lange zurückliegen, fand die erste Übertragung durch Rindenpfropfung 1952 durch POSNETTE und CROPLEY statt. Bei Versuchen zur Übertragung des Apfelmosaikvirus durch Okulation wurde wiederholt festgestellt, daß einzelne Knospen kranker Bäume symptomlose Blätter entwickeln (POSNETTE und CROPLEY 1956, CHRISTOFF 1958). CHRISTOFF zog hieraus den Schluß, „daß das Virus nicht in sämtliche Teile des infizierten Baumes eindringt". POSNETTE und CROPLEY fanden, daß besonders schnell wachsende Triebe und die an den Triebenden inserierten Knospen häufig virusfrei sind.

Um die Übertragbarkeit der in unseren Versuchen verwendeten Virusherkunft zu prüfen, wurden 14 Apfelsämlinge am 12. 5. 1956 mit je 4 Rindenschildchen gepfropft, die von Reisern eines mosaikkranken Baumes der Sorte „Lady Sudeley" stammten. Dieser Baum zeigte im Gegensatz zu den zur Prüfung von Edelsorten und *Malus*-Formen herangezogenen Bäumen eine bedeutend geringere Verseuchung, da die Symptome nur vereinzelt und bedeutend schwächer hervortraten. Von den inokulierten Apfelsämlingen zeigte Mitte Mai 1957 die Hälfte deutliche Symptome in Form hellgrüner Scheckung bis zu teilweiser oder bandartiger Vergilbung der Blattspreite. Die restlichen 7 Sämlinge blieben auch im folgenden Jahre symptomlos. Der relativ geringe Infektionserfolg läßt auf ungleichmäßige Verbreitung des Virus im Wirt schließen.

Zur Übertragung des Virus durch Okulation ist eine Verwachsung der Knospe nicht immer notwendig. Am 24. Juli 1957 wurden 46 zweijährige M IV-Unterlagen mit je 2 Knopsen kranker Reiser der Sorte „Lady Sudeley" okuliert. Die Blätter, in deren Achseln sich die Knospen befanden, zeigten

in jedem Falle deutliche Symptome. Die Okulationen mußten, da während der für die Veredlung geeigneten Zeitspanne ungünstige Witterungsbedingungen herrschten, bei feucht-kalter Witterung durchgeführt werden. Im Frühjahr 1958 war festzustellen, daß keine der okulierten Knospen verwachsen war. Trotz dieser Tatsache zeigten 24 Pflanzen im Laufe des Sommers 1958 deutliche Symptome. Zum Haften der Infektion hat demnach der vorübergehende Kontakt der Kambialschichten der Knospe und der Unterlage ausgereicht.

Über erfolgreiche mechanische Übertragung des Apfelmosaikvirus von Apfel auf krautige Pflanzen ist von YARWOOD (1953, 1955, 1957) und YARWOOD und THOMAS (1954) berichtet worden. Da Untersuchungen über physikalische Eigenschaften des Virus eine mechanische Übertragbarkeit voraussetzen, wurden gleichartige Versuche mit dem „Lady Sudeley"-Virus angestellt. Das Inokulationsverfahren wurde weitgehend an die Methodik von YARWOOD angeglichen. Soweit möglich, verwendeten wir auch die gleichen Testpflanzen. Die Versuchsbedingungen wurden dahingehend variiert, daß die Abreibungen unter Zusatz verschiedener Pufferlösungen an unverdunkelten

Tabelle 3

Geprüfte Testpflanzen und angewandte Versuchsbedingungen zur mechanischen Übertragung des AMV

Testpflanze	Verdunkelung vor der Inokulation in Std.	Temperatur während der Inokulation in °C	pH-Werte der Pufferlösungen	Inokulationsverfahren
Nicotiana glutinosa L.	—; 5; 24	7—9; 17; 20	5,6; 5,9; 6,3; 6,9	Glasspatel, Fingerkuppe, Wundfläche, Exsudat, Blattstielpfropfung
Nicotiana tabacum L. var. „Samsun"	—; 24	20	6,0; 6,9	Glasspatel, Wundfläche, Exsudat, Blattstielpfropfung
Datura stramonium L.	—; 20	20	6,3; 6,9	Glasspatel
Datura metel L.	—	20	6,1; 8,1	Glasspatel, Exsudat
Phaseolus vulgaris L. var. „Bountiful"	—; 20	20	5,9; 6,9	Glasspatel, Fingerkuppe
Phaseolus vulgaris L. var. „Burgers Brittle"	—	20	6,9	Glasspatel
Phaseolus vulgaris L. var. „Prinzeß"	—; 22	20	6,9	Glasspatel, Fingerkuppe, Wundfläche
Phaseolus vulgaris L. var. „Top Notch"	—	20	6,1; 6,9	Glasspatel
Vigna sinensis L.	—; 24; 72	9; 20	5,6; 6,3 6,9; 8,4	Glasspatel, Wundfläche, Exsudat
Cucumis sativus L. var. „Delikateß"	—; 22; 120	12; 20	5,6; 5,9; 6,9; 8,1; 8,4	Glasspatel mit Watte, Wundfläche

Pflanzen bei 20 °C mit dem Glasspatel bzw. mit der Fingerkuppe vorgenommen wurden. Bei Variation der Temperaturen wurden stets Pufferlösungen vom pH-Wert 6,9 verwendet. Letzeres galt auch bei der Abreibung von Wundflächen. Die bei den jeweiligen Testpflanzen angewandten Versuchsbedingungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Außerdem wurden bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen (keine Verdunkelung der Pflanzen, Inokulationstemperatur 20 °C, pH-Wert des zugesetzten Puffers 6,9, Inokulation mit dem Glasspatel) folgende Testpflanzen inokuliert:

Capsicum annuum L., *Solanum nigrum* L., *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn., *Vicia faba* L., *Antirrhinum majus* L., *Celosia argentea* L. var., *cristata* Kuntze, *Senecio vulgaris* L., *Zinnia elegans* Jacq., *Petunia hybrida* Vilm., *Lathyrus pratensis* L., *Callistephus chinensis* Nees., *Dianthus barbatus* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Apium graveolens* L., *Geum urbanum* L., *Helianthus annuus* L., *Fragaria indica* L. und *Malus pumila* L.

Bei keiner der inokulierten Arten konnten die Ergebnisse von YARWOOD bestätigt werden. Unter den genannten Versuchsbedingungen ist das Apfelmosaikvirus auf die geprüften Pflanzenarten mechanisch nicht übertragbar. Zu gleichen Ergebnissen gelangten THOMAS (1937), HOCKEY (1943) sowie POSNETTE und CROPLEY (1956).

6. Wärmetherapie

Versuche zur Heilung viruskranker Obstbäume oder -reiser durch Wärmebehandlung führte bereits KUNKEL (1936) mit Erfolg durch. Die jungen Bäume wurden 14 Tage bei 35 °C gehalten bzw. 10 min in 50 °C warmes Wasser getaucht. Auf diese Art konnten sie von den Viren der Vergilbungskrankheit und der Kleinfrüchtigkeit des Pfirsichs geheilt werden. CRISTOFF (1958) gelang durch Warmluftbehandlung viruskranker Reiser die Inaktivierung von 7 verschiedenen Obstviren, u. a. auch die des Apfelmosaikvirus.

Die Wärmetherapie kann sowohl für die Kenntnis des thermalen Inaktivierungspunktes des Virus in vivo als auch für die Gewinnung virusfreier Sorten und Unterlagen Bedeutung erlangen. Die Reiserbehandlung hat den Vorteil, daß sie kurzfristiger und technisch einfacher ist und Reiser weniger empfindlich sind als Pflanzen während der Vegetationsperiode.

Die Ergebnisse der an Reisern eines vollständig verseuchten „Lady Sudeley"-Baumes in den Jahren 1957, 1958 und 1959 durchgeführten Wärmebehandlungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Bei Behandlung mit höheren Temperaturen geht der Verwachsungserfolg zurück. Läßt man die damit verbundene geringere Sicherheit des Befundes außer acht, so geht aus der Zusammenstellung hervor, daß das Apfelmosaikvirus durch Warmwasserbehandlung nicht und durch Warmluftbehandlung bei 70 °C (10 min) inaktiviert werden konnte.

Tabelle 4

Ergebnisse der Wärmebehandlung mosaikkranker Apfelreiser

Behandlungs-temperatur in °C	Behandlungs-dauer in min	Verwachsung der Reiser:		Symptome	
		verwachsen	gepfropft	behandeltes Reis	Indikator
		1957 Warmwasserbehandlung			
35	120	10	10	+	+
40	45	10	10	+	+
40	90	7	10	+	+
50	5	4	10	—?	—?
		1958 Warmwasserbehandlung			
50	10	0	15	0	0
55	10	0	15	0	0
58	5	0	15	0	0
60	10	0	15	0	0
		1958 Warmluftbehandlung			
55	10	13	15	+	+
58	10	11	15	+	+
60	10	12	15	+	+
70	10	8	15	—	—
		1959 Warmwasserbehandlung			
46	15	6	6	+	+
46	20	4	6	+	+
48	10	5	6	+	+
48	15	5	6	+	+
50	5	3	6	+	+
50	7	2	6	+	+
55	2	2	6	+	+
55	5	0	6	0	0
55	7	0	6	0	0
35 40	120 10	5	6	+	+
35 48	120 15	0	6	0	0
45 50	15 5	3	6	+	+

Die geringere Empfindlichkeit der Reiser bei Warmluftbehandlung gegenüber der Warmwasserbehandlung läßt darauf schließen, daß durch die geringere Wärmeleitfähigkeit der Luft die Erwärmung des Reises langsamer erfolgt als bei Warmwasserbehandlung. Die Messung der zwischen Reisinnerem und Behandlungsmittel herrschenden Temperaturdifferenz bestätigt diese

Annahme. Wie der folgende Versuch beweist, stimmt nur bei Warmwasserbehandlung die Temperatur des Außenmediums mit der im Inneren des Reises überein (Abb. 9).

Die Temperaturangleichung erfolgte um so schneller, je höher die Behandlungstemperatur und je dünner das Reis waren. Bei Behandlungen über 55 °C war sie nach einer halben Minute abgeschlossen. Sichere Differenzen zwischen Rinden- und Holztemperatur waren nicht festzustellen, da der Ausgleich sehr schnell erfolgte.

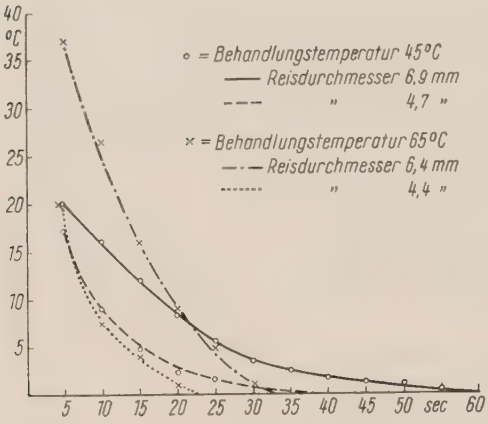


Abb. 9. Temperaturdifferenz zwischen Reis und Erwärmungsmittel bei Warmwasserbehandlung (Raumtemperatur 20 °C; Messung in Reismitte)

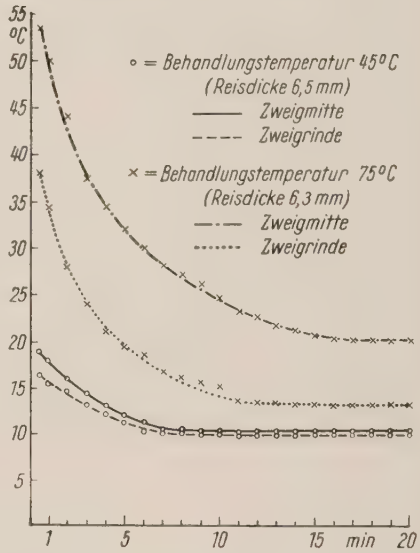


Abb. 10. Temperaturdifferenz zwischen Reis und Erwärmungsmittel bei Warmluftbehandlung (Raumtemperatur 20 °C)

Einen ähnlichen Verlauf nahm die Temperaturangleichung bei Warmluftbehandlung. Sie verlief allerdings wesentlich langsamer (Abb. 10).

Aus den Temperaturmessungen bei Warmluftbehandlung geht hervor, daß die Temperaturangleichung unter der Rinde schneller verlief als in der Reismitte. Ferner war festzustellen, daß nach einem gewissen Absinken der Temperaturdifferenz für längere Zeit im Reis nahezu Temperaturkonstanz herrschte. Temperaturausgleich zwischen Reis und Warmluft trat erst nach einigen Stunden ein, wenn das Reis vertrocknet war.

Diskussion

Obwohl das Apfelmosaik in anderen Ländern zu beträchtlichen wirtschaftlichen Schäden führen kann, hat es im Gebiet der DDR bisher nur untergeordnete Bedeutung. Die geringe Verbreitung läßt sich unter anderem dadurch erklären, daß die am häufigsten angebauten Sorten und Unterlagen nach bisherigen Feststellungen mit virulenten Stämmen dieses Virus nicht in-

fiziert sind. Über eine mögliche latente Verseuchung stehen Untersuchungen noch aus.

Die zum Teil erheblichen Unterschiede innerhalb verschiedener Sorten und *Malus*-Formen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber dem Apfelmosaikvirus können auch bei relativ enger Verwandtschaft auftreten. So sind z. B. die Sorten „Komsomolez" und „Bellefleur Rekord" aus Kreuzungen von „Bellefleur Kitaika" × „Jachontowoje" hervorgegangen (Mitschurin 1951). „Komsomolez" zählt zu den anfälligsten Sorten und wird deshalb als Indikator verwendet. „Bellefleur Rekord" reagiert demgegenüber sehr schwach und neigt vielfach zur Maskierung der Symptome. Diese Erscheinung kann mit der bereits erwähnten Unterschiedlichkeit der Reaktion von Apfelsämlingen, die einen gemeinsamen Elter besitzen, verglichen werden.

Die Übertragung von Obstviren trotz unterbliebener Verwachsung zwischen Reis bzw. Knospe und Unterlage wurde bereits von Kunkel (1936) festgestellt. Er fand, daß zur Übertragung des Pfirsichmosaikvirus eine Kontaktdauer von zwei bis drei Tagen zwischen kranker Knospe und gesundem Pfirsichsämling genügte. Die für die Übertragung des Virus vermutlich notwendige Plasmodesmenverbindung zwischen krankem und gesundem Gewebe müßte demnach in zwei Tagen eingetreten sein. Auch bezüglich der Apfelokulationen ist es denkbar, daß zunächst derartige Verbindungen bestanden haben, bevor die Knospen abstarben. Eine Wundinfektion ist auf Grund der Ergebnisse der mechanischen Übertragung weniger wahrscheinlich.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der mechanischen Übertragung des Apfelmosaikvirus, die aus den Versuchen von Yarwood und den eigenen hervorgingen, lassen sich dahingehend deuten, daß sich die von Yarwood und mir verwendeten Virusherkünfte in ihrer mechanischen Übertragbarkeit grundsätzlich unterscheiden. Gilmer (1958) konnte nachweisen, daß das mechanisch übertragbare Virus von Yarwood mit dem Apfelmosaikvirus nicht identisch ist. Es ist wahrscheinlich mit dem Tabakstrichelvirus verwandt und ruft beim Apfel nach relativ kurzer Inkubationszeit starke Symptome hervor, die dem Apfelmosaik weitgehend gleichen. Das Apfelmosaikvirus konnte auch von Gilmer mechanisch nicht übertragen werden.

Für therapeutische Behandlungen von Obstreisern mit Warmluft ergibt sich aus den Untersuchungen, daß der bei bestimmter Temperatur erreichte Heilungserfolg nicht mit dem Inaktivierungspunkt des Virus in vivo identisch ist. Dieser läßt sich nur durch Warmwasserbehandlung ermitteln. Warmluftbehandlung scheint jedoch schonender zu verlaufen. Dies geht aus den Versuchen von Christoff (1958) hervor, dem die erfolgreiche Wärmebehandlung bei verschiedenen Stein- und Kernobstvirosen gelang. Christoff stellte bei einer Einwirkungsdauer von 10 min die Inaktivierung des Apfelmosaikvirus durch Warmluftbehandlung bei 60 °C fest. In eigenen Versuchen konnte sie erst bei 70 °C erreicht werden. Diese Differenz kann auf verschiedenen Faktoren wie Virusherkunft, Reiserdicke, Wirtssorte, Holzreife der Reiser u. a. beruhen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Apfelmosaik tritt in der DDR nur sporadisch auf. Bevorzugter Befall einer Sorte wurde nicht festgestellt. Innerhalb verschiedener Sorten und *Malus*-Formen bestehen erhebliche Unterschiede in der Virusresistenz. Die höchste Anfälligkeit zeigten „Komsomolez", „Elisabethapfel", „Rebristoje", *Malus lancifolia* Rehd. und *M. ioensis* (Wood.) Brit. Die geringste Anfälligkeit bzw. keine Symptome zeigten „Weißer Astrachan", „Bellefleur Rekord", *Malus micromalus* Mak., *M. cerasifera* Spach., *M. fusca* (Raf.) Schneid., *M. toringoides* Hughes und *M. robusta* Rehd.

Das Virus ist durch Pfropfung, Okulation und Rindenschildchen übertragbar, wobei die Pfropfpartner nicht zu verwachsen brauchen. Die mechanische Übertragung des Apfelmosaikvirus gelang nicht.

Das Virus konnte durch Warmluftbehandlung bei 70 °C in 10 min in kranken Reisern der Sorte „Lady Sudeley" inaktiviert werden. Bei Warmwasserbehandlung hat das Reis spätestens 1 min nach dem Eintauchen die gleiche Temperatur wie das umgebende Wasser. Bei Warmluftbehandlung erfolgt die Erwärmung langsamer, so daß nach 10 min in Abhängigkeit von der Behandlungstemperatur zwischen Reis und Außenluft Differenzen von 10 bis 25 °C bestehen. Die Inaktivierungstemperatur des Virus im Reis kann nur durch Warmwasserbehandlung bestimmt werden.

Die Warmwasserbehandlung blieb ohne Erfolg.

Summary

Investigations on virus diseases of pome fruit
Apple mosaic virus

Apple mosaic occurs in the German Democratic Republic only sporadically. No particular variety is attacked more than others. Considerable differences in virus resistance exist within the different varieties and *Malus* forms. The greatest susceptibility was found in Komsomolez, Elisabethapfel, Rebristoje, *Malus lancifolia* Rehd. and *M. ioensis* (Wood) Brit. The lowest susceptibility, or absence of symptoms, was found in Weisser Astrachan, Bellefleur Rekord, *Malus micromalus* Mak., *M. cerasifera* Spach., *M. fusca* (Raf.) Schneid., *M. toringoides* Hughes and *M. robusta* Rehd.

The virus is transmissible by grafting, budding and pieces of bark, it being unnecessary even for the graft partners to fuse. Attempts to transmit apple mosaic virus mechanically were unsuccessful.

The virus could be inactivated in diseased shoots of the variety Lady Sudeley in 10 min. by treatment with warm air at 70 °C. With warm water treatment the shoot reaches the same temperature as the surrounding water in 1 min. from immersion. With warm air treatment the heating occurs more slowly, so that after 10 min., according to the temperature of treatment,

differences of 10 — 25 °C. can exist between the shoot and the surrounding air. The temperature of inactivation of the virus can be determined only by warm water treatment. Treatment with warm water was without effect.

Literaturverzeichnis

Atkinson, J. D., and E. E. Chamberlain, 1948: Apple mosaic in New Zealand. N. Z. j. sci. techn. **30**, 1—4.

Baumann, G., und M. Klinkowski, 1955: Ein Beitrag zur Analyse der Obstvirosen des mitteldeutschen Raumes. Phytopath. Z. **25**, 55—71.

Blumer, S., 1955: Viruskrankheiten der Obstbäume. Versuchsanst. Obst-, Wein- u. Gartenb. Wädenswil, Flugschr. Nr. 51, 1—19.

Bradford, J. C., and L. Joley, 1933: Infectious variegation in the apple. J. agricult. res. **46**, 901—908.

Christoff, A., 1934: Mosaikkrankheit oder Viruschlorose bei Äpfeln. Eine neue Viruskrankheit. Phytopath. Z. **7**, 521—536.

— —, 1958: Die Obstvirosen in Bulgarien. Phytopath. Z. **31**, 381—436.

Foschi, S., 1951: La „plastomania" del melo Gravenstein. Inform. fitopat. **12**, 6.

Gilmer, R. M., 1958: Two viruses that induce mosaic of apple. Phytopathology **48**, 432 bis 434.

Harvey, H. L., 1957: Apple mosaic — a virus disease. J. dep. agric. Western Australia **6**, 427—429.

Hockey, J. F., 1943: Mosaic, false sting and flat limb of apple. Sci. agric. **23**, 633—646.

Jamalainen, E. A., 1957: Virustaudeita ja virustautien kaltaisista kasvitaudeista suomessa. Valtion maatalouskoetoiminnau julkaisuja Nr. **158**, 44.

Johnson, J., 1951: Virus particles in various plant species and tissues. Phytopathology **41**, 78—93.

van Katwijk, W., 1953: Virusziekten in de vruchtboomkwekerij. Versl. meded. plantenziektenkundigd. Wageningen, Nr. 119, 1—27.

Kunkel, L. O., 1936: Heat treatment for the cure of peach yellows and other virus diseases of peach. Phytopathology **26**, 809—830.

Lihnell, D., 1949: Virusjukdomar hos fruktträd och bärväxter. Sver. pomol. för årsskr. **50**, 36—50.

Mitschurin, I. W., 1951: Ausgewählte Schriften. Berlin.

Morvan, G., 1957: Problèmes posés par les maladies à virus à l'arboriculture fruitiére francaise. Bull. techn. inf. Nr. **123**, 1—22.

Orton, C. R., and J. I. Wood, 1924: Diseases of fruit and nut crops in the United States in 1923. Plant dis. reptr. **33**, 1—147.

Peterson, L. P., 1956: Die Viruskrankheiten des Apfels in den Verhältnissen der lettischen SSR. 1. Konf. Fragen Pflzschutz Riga 205—213 (russ.).

Posnette, A. F., and R. Cropley, 1952: A preliminary report on strains of the apple mosaic virus. Ann. rep. East Malling res. sta. 1951, 128—130.

— —, and — —, 1956: Apple mosaic viruses. Host reactions and strain interference. J. hortic. sci. **31**, 119—133.

— —, and — —, 1959: The reduction in yield caused by apple mosaic. Ann. rep. East Malling res. sta. 1958, 89—90.

*RAMSFJELL, T., 1950: Virussjukdommer pa eple. Gartneryrket **20**, 7.

THOMAS, H. E., 1937: Apple mosaic. Hilgardia **10**, 581—588.

VASUDEVA, R. S., 1958: News from India. Comm. phytopath. news **4**, 31.

*WALLACE, T., L. OGILVIE and T. SWARBRICK, 1944: Two virus diseases of tree fruits. Gard. chron. **116**, 140—141.

YARWOOD, C. E., 1953: Quick inoculation by rubbing with fresh leaf discs. Plant dis. reptr. **37**, 501—502.

— —, 1955: Mechanical transmission of an apple mosaic virus. Hilgardia **23**, 613—628.

— —, 1957: Juice transmission of viruses to peach. Phytopathology **47**, 38.

— —, and H. E. THOMAS, 1954: Mechanical transmission of 3 fruit tree viruses. Phytopathology **44**, 511.

* Die Arbeiten waren nur im Referat zugänglich.

From the Department of Special Botany
of the Swiss Federal Institute of Technology in Zurich
Director: Prof. Dr. E. Gäumann

Observations on the Production, Physiological Activity and Chemical Nature of Colletotin, a Toxin from *Colletotrichum fuscum* Laub.

By

Robert N. Goodman

With 3 figures

Introduction

Digitalis lanata and *D. purpurea* plants failed to demonstrate visible disease symptoms in response to artificial inoculation with a spore suspension of *Colletotrichum fuscum* Laub. for almost 5 full days. During the first 4 days of the incubation the plants were kept in moist chambers at approximately 95 % relative humidity. Throughout the entire period the temperature varied between 24 and 28 °C. Late on the fifth day a limited number of water-soaked lesions became visible as well as a peripheral leaf wilt. On the 6th and 7th days a few additional leaf lesions appeared; however, the flaccidity at the leaf edges rapidly progressed to the leaf centers and to the petioles, culminating in a collapse of the entire plant and death by the end of the eighth day. The unusual feature of this artificial inoculation experiment was that the typical leaf lesions associated with "anthracnose" of *Digitalis* did not appear in significant numbers, and the disease proceeded without apparent severe damage to the host plants until terminal symptoms had developed.

This sequence of events seemed indicative of extensive internal progress of the pathogen in host tissue and/or the elaboration of a potent toxin. To explore the possibilities of toxin production, 2 isolates of *C. fuscum* obtained from damped-off seedlings of *D. lanata* and *D. purpurea* and a third culture, obtained from the collection at Baarn, Netherlands (von Arx strain), were evaluated for their ability to produce an active toxic principle.

CHAPTER 1

Materials and Methods

Colletotrichum fuscum was grown on a 2 % malt, 1 % glucose, 2 % agar medium and was incubated at 27 °C. The liquid media employed was a

modified Richards' solution which contained 4 g. NH_4NO_3, 2.7 g. KH_2PO_4, 1.2 g. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.028 g. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.003 g. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and 30 g. glucose in 1000 ml. of ion free water. One ml. of a water suspension of spores or mycelial slurry was used to inoculate 500 ml. Erlenmeyer flasks containing 100 ml. of the nutrient solution. Four liter fermentors were inoculated with 50 ml. of a spore suspension obtained from 5 agar slants or 100 ml. of a 5 day-old shake culture. Incubation temperatures at which toxin production was evaluated were 24 and 27 °C. Erlenmeyer flask cultures were agitated on a rotary shaker whereas the fermentors were agitated by a reciprocating device.

Culture filtrates were tested daily for activity after the initial 4 days of incubation. Activity was detected with a bioassay developed by GÄUMANN and JAAG (1950). This method was slightly modified to evaluate the effect of the toxin on *Digitalis* foliage. To prevent rapid wilt, excised *Digitalis* leaves were suspended in vials containing the test fluids which were placed on water saturated mats of filter paper and absorption proceeded under a bell jar. In addition, leaves of *Digitalis* were kept in the test solutions during the entire experiment and not, as in the tomato shoot assay, transferred to tap water after a 6 hours absorption period.

The initial step in testing for toxin activity and collecting the toxin required separation of the mycelium from the medium and this was accomplished by filtration. The toxic principle was obtained from the culture filtrate by precipitating it with acetone. A 1 : 1 acetone-culture filtrate mixture resulted in a heavy precipitate which was generally inactive and was therefore discarded. Successive additions of acetone to culture filtrate, usually 1 : 4 or 1 : 5 v/v, were made until little or no further precipitate could be discerned. The precipitate was removed from the culture filtrate by either centrifugation or filtration through a Buchner funnel containing a 1 cm layer of celite. For large volumes of culture filtrate the filtration process was preferred and the celite was freed of the toxin-bearing precipitate with ion-free water. Washing the celite 3 times with 30 ml. aliquots of water was standard procedure. Each filtered fraction was tested for activity and stored at 0 °C. and the active fractions were composited and lyophilized to dryness.

CHAPTER 2

Culture of the organism and toxin production

Each of the three strains of *Colletotrichum fuscum* were able to produce an extremely active toxin. The toxic principle has therefore been named Colletotin. It was possible to obtain Colletotin from both Erlenmeyer flask cultures and the 4 liter fermentors. Further, the toxin was produced with either spores or a mycelial suspension as a source of inoculum. Of the 2 temperatures tested 24 and 27 °C., the latter was superior. This was particularly evident for production of the toxin in the larger capacity fermentors.

Toxin production occurred more rapidly in the 4 liter fermentors than in the Erlenmeyer flasks. Peak production appeared in the flasks after 17—18 days and in the fermentors a similar titer of toxin was occasionally achieved in 10 days. Nevertheless, the production of Colletotin was more regularly obtained from flask cultures. A typical toxin production curve plotting days of incubation against concentration of toxin in the culture filtrate is shown in Figure 1.

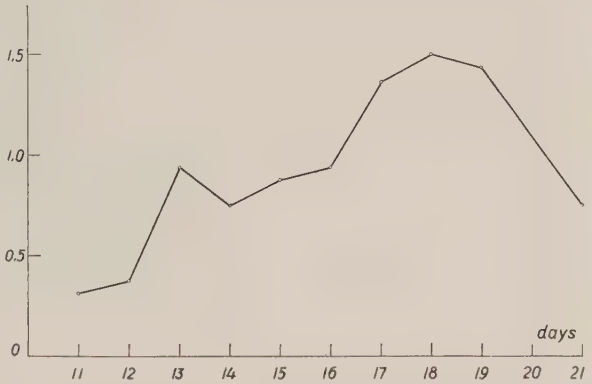


Fig. 1. Production of toxin in a flask-shake culture as measured by the activity of the culture filtrate against tomato shoots. Ordinate: Spotting intensity of the culture filtrate. Abscissa: Time of incubation in days

Concomittant with the production of toxin a rise in pH was regularly observed in the flask cultures. The pH usually rose from 4.5, noted 24 hours after inoculation, to 6.8—7.0 after 17—18 days. Thus, peak toxin production was achieved, almost without exception, when the pH of he culture filtrate had reached neutrality. This was not always the case with the fermentors, as extremely high titers of the toxin were produced at a pH of 4.8.

Characteristics of the vegetative growth of the cultures also changed during the incubation period. The fungus grew slowly for the first 4 days, particularly where spores were used as the inoculum. At first discreet oval mycelial particles were formed, after which the cultures became turbid and increasingly viscous. Mycelial color also changed from off-white to pinkish-red and finally to a reddish tan and at the termination of the incubation the period black acervuli were often visible. The color of the culture filtrate ranged from colorless at the outset to brilliant yellow at the end. Intensity of yellow color and pH were excellent indicators of toxin production, but they were not infallible.

CHAPTER 3

Physiological affects

§ 1. On tomato shoots

The earliest indications of toxin activity were observed at 7—9 days in flask cultures and after 5—7 days in fermentors. This affect was a leaf curl which was apparent after 24 hours, but, was transient in that tomato plants no longer showed the aberration after 48 hours. The leaf curl was usually more prevalent in filtrates from fermentors and was associated with an acid fermentation.

By the 11th day the primary toxic effect, numerous discreet sunken leaf lesions, was apparent and these are shown in Figure 2. Inspection of these lesions under the microscope revealed epidermal cells that were relatively normal, whereas, the palisade cells had been plasmolized. Of further import was the observation that the vascular tissues in the sunken areas were light brown in color.

Leaf spotting was consistently more intense in the lowermost leaf of the tomato shoot. This suggested that the substance causing the spots was water soluble and was moving with the transpiration stream. The lowest leaf was of course more fully expanded and therefore exerted the greatest transpirational pull on the toxin containing reservoir.

Fig. 2. Numerous sunken leaf lesions on a tomato leaf caused by a culture filtrate of *Colletotrichum fuscum*. The culture filtrate was diluted 1 : 5. a) Spotting as revealed with light from below. b) Spotting as revealed with light from above

There was also an occasional appearance of stem injury wherein the stem tissues collapsed, indicating plasmolysis of the vascular and associated tissues. This condition could definitely be dissociated from a pH affect and was noted in samples of toxin-bearing precipitate that had been produced in the fermentors.

Thus it was obvious that cultures of *C. fuscum* could, under varying conditions, produce more than one toxic effect and that it was possible that the acetone precipitate contained more than one active substance. However, the name Colletotin was selected to designate the "spotting principle" which occurred regularly and was by far the most active one. For example, a culture filtrate from a flask culture which was lyophilized to dryness and resuspended in water was able to induce intense spotting at 200 γ/ml. Upon extraction of Colletotin from the culture filtrate with acetone the resultant amorphous precipitate regularly caused leaf lesions at a concentration of 60 γ/ml. and occasionally at 30 γ/ml.

When Colletotin was applied with a brush to the upper and lower surfaces of tomato foliage, at a concentration of 2500 γ/ml., it caused a scattered darkening at and near some veins. This affect was more pronounced when the toxin was applied to the lower surfaces. Protuberant veins, trichomes, less cuticle and a larger number of stomata at the lower surface might have influenced this situation.

§ 2. Affect upon *Digitalis*, the host plant

Young excised *Digitalis* leaves, with petiole bases submerged in the culture filtrate revealed, after 3 days, a loss of leaf turgor, a leaf edge wilt and a paling of the chlorophyll. After three days these effects were apparent at 2500 γ/ml., however, after 6 days they could be detected in leaves that had been suspended in solutions containing as little as 17 γ/ml. of Colletotin. In some instances a light leaf mottle was also apparent, however no sunken or pitted areas developed. In general the syndrome induced by Colletotin was quite similar to that observed in *Digitalis* leaves following artificial inoculation. The syndrome was also more pronounced in *D. lanata* than in *D. purpurea*, which was interesting, since the former is more susceptible to *C. fuscum* than the latter.

CHAPTER 4

Chemical composition of Colletotin

§ 1. Physical characteristics

The acetone precipitate which was found to contain the toxic activity previously described, was extremely water soluble. The rate at which it is precipitated from the culture filtrate by acetone is shown in Figure 3. The toxin was, in addition, observed to be insoluble in such organic solvents as methanol, ethanol, ether, chloroform, methyl cellosolve and pyridine.

Colletotin activity was not adsorbed on either cationic or anionic exchange resins. It was however, adsorbed by Franconite a kaolin-type clay. 1000 and 2000 γ/ml. solutions of the toxin were heated to 100 °C. and aliquots were removed at 10 minute intervals. Data of residual activity after the heat treatment are shown in Table 1 and from these it is apparent that the toxin is heat stable.

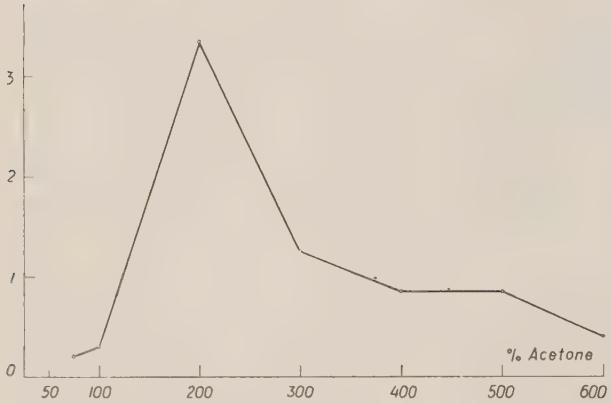


Fig. 3. Fractional precipitation of an 18-day culture filtrate of *Colletotrichum fuscum* with acetone. The precipitate was washed 3 times, resuspended in 5 ml. of water and tested for activity against tomato shoots. Ordinate: Spotting intensity of the precipitate. Abscissa: Percent acetone

Colletotin was also exposed to cold acid and alkali for one hour and here too it was found to resist degradation.

Table 1

Heat Stability of Colletotin at 100° Centigrade

Toxin Concentration	Spotting activity at various exposure times (minutes)						
	0	10	20	30	40	50	60
2000 γ/ml.	2.2	2.1	1.6	1.8	1.8	2.0	2.0
1000 γ/ml.	2.5	2.5	2.1	2.3	2.0	2.0	1.2

§ 2. Paper chromatography of the toxin and toxin-hydrolysates

Attempts to separate the "spotting principle" from other possible fractions in the acetone precipitate chromatographically in n-butanol-acetic acid-water, n-propanol-water and phenol-water systems were unsuccessful. Two fluorescent fractions and a ninhydrin positive fraction migrated on the paper, however, upon elution from the paper they proved to be inactive. The toxin activity, however, remained at the starting line and at this position gave an extremely strong ninhydrin positive reaction.

When the toxin was hydrolized with 6 N HCl for 4 hours at 100 °C and reacted with BERTRANDS solution the presence of reducing sugars was revealed. Chromatogramming the HCl hydrolysate and treating the paper with aniline phthalate confirmed the presence of reducing hexoses. Additional chromatograms with known hexose standards indicated that the hexoses were

glucose, galactose and mannose. When this hydrolysate was chromatogrammed and sprayed with ninhydrin reagent the migration of a number of amino acids became evident. Furthermore, the area of the starting line on the chromatogram was no longer ninhydrin positive. Thus, the strong acid hydrolysis had evidently degraded a peptide fraction freeing a number of amino acids and a polysaccharide or glycoside which liberated the hexoses.

The toxin was also hydrolized with 0.5 N HNO_3 for 4 hours at 100 °C. This mild hydrolysis resulted in the migration of the 3 hexoses on the chromatogram, but the peptide remained essentially at the starting line.

Of particular importance here is the fact that both the mild and strong hydrolyses destroyed the activity of the toxin.

§ 3. Dialysis of the toxin

Dialysis of the toxin revealed that the "spotting principle", Colletotin, was not dializable. To further verify the chemical nature of Colletotin the solutions on each side of the dialysis membrane were reacted with Folin and Anthrone reagents. The results from these tests appear in Table 2 and confirm the presence of a polysaccharide and a peptide in the toxin-bearing acetone precipitate.

Table 2

Chemical Analyses of Dialysis Solution*)

Position	Folin reaction γ/ml. albumin equiv.	Anthrone reaction γ/ml. glucose equiv.	Toxin activity
inside the membrane	172	> 200	+
outside the membrane	128	trace	—

*) The toxin solution prior to dialysis was at a concentration of 5000 γ/ml. and was heat treated for 10 minutes at 100 °C to destroy enzyme activity.

From the foregoing chemical analyses certain conclusions regarding the chemical nature of Colletotin activity can be drawn. The fact that the mild hydrolysis as well as the strong one destroyed toxin activity suggests that the polysaccharide fraction must retain its integrity in order to remain active. The dialysis experiment indicated that the polysaccharide remained essentially inside the membrane whereas a portion of the peptide fraction was dialized. Since Colletotin activity was detected only on the inside of the membrane, it seems logical to assume that the polysaccharide is essential for toxin activity. It is also quite possible that the peptide fraction remaining within the membrane contributes to the toxic effect.

Summary

Symptom expression of *Digitalis lanata* and *purpurea* artificially inoculated with a spore suspension of *Colletotrichum fuscum* Laub. suggested that the pathogen elaborated a potent toxin. Shake flask cultures and fermentors inoculated with 3 strains of *Colletotrichum fuscum* either as spores or my-

celial suspensions revealed the presence of an extremely active toxin. The toxin induced a leaf spot on tomato foliage at concentrations as low as 30 γ/ml. Foliage of the host plant *Digitalis* demonstrated a loss of leaf turgor, leaf edge wilt and chlorophyll paling in response to a 6-day exposure to concentrations as low as 17 γ/ml. These symptoms were similar to those elicited by the fungus on the host plant. The toxin principle which caused these symptoms has been named Colletotin.

Chemical analyses indicated that the toxin is non-dializable, water soluble, insoluble in organic solvents and is stable at 100 °C for one hour and in cold acid and alkali for a similar period. The toxin also consists of a polysaccharide and peptide fraction and the integrity of the former is essential for the retention of toxin activity.

Zusammenfassung

Die Krankheitssymptome, die auf den Blättern von *Digitalis lanata* und *purpurea* nach künstlicher Infektion mit *Colletotrichum fuscum* Laub. auftreten, lassen vermuten, daß der Erreger ein wirksames Toxin produziert. In Schüttelkulturen, Erlenmeyerkolben und Fermentern, die mit Sporen- oder Myzelsuspensionen dreier verschiedener Pilzstämme beimpft wurden, konnte ein sehr aktives Toxin nachgewiesen werden. Es verursacht in Konzentrationen von 30 γ ml Nekrosen auf Tomatenblättern, während Digitalisblätter, die 6 Tage lang in eine Toxinlösung von 17 γ/ml eingestellt wurden, Turgorverlust, Welkeerscheinungen am Blattrand und ein Ausbleichen des Chlorophylls zeigten. Diese Symptome entsprechen denjenigen, die vom Pilz in der Wirtspflanze induziert werden. Das toxische Prinzip, das diese Schädigung auslöst, wurde Colletotin genannt.

Colletotin ist nicht dialysierbar, löslich in Wasser, unlöslich in organischen Lösungsmitteln, stabil nach einstündigem Erhitzen auf 100 °C, wie auch in Alkali und Säure bei Zimmertemperatur. Es besteht aus einer Polysaccharid- und einer Peptid-Fraktion, wobei erstere für die phytotoxische Aktivität verantwortlich zu machen ist.

Literature

Gäumann, E., and O. Jaag, 1950: Über das toxigene und physikalisch induzierte Welken. Phytopath. Z. **16**, 226—256.

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin

Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz von zwei verschiedenen Knollenselleriesorten gegenüber der Blattfleckenkrankheit (*Septoria apii-graveolentis* Dorogin[1])

Von

HANNELORE BÖHME

Mit 5 Abbildungen

Die *Septoria*-Blattfleckenkrankheit ist eine der gefährlichsten Krankheiten des Selleries. Die Ertragsminderung durch *Septoria*-Befall stellt nach REINHOLD (1939) „das größte Risiko des Sellerieanbaus" dar.

Wahrscheinlich ist diese Krankheit so alt wie die Selleriekultur überhaupt (CHUPP 1925). Berichtet wird über sie und ihr schädigendes Auftreten aber erst seit dem Ende des 19. Jahrhunderts. Ältere Mykologen haben zwar *Puccinia apii* (DESMAZIÈRES 1823) und *Cercospora apii* (FRESENIUS 1863), aber keine *Septoria* auf Sellerie beobachtet. BRIOSI und CAVARRA veröffentlichten im Jahre 1890 die erste wissenschaftliche Abhandlung über das Auftreten dieser Krankheit in Italien. Ihr folgten in den nächsten Jahren Berichte aus Amerika und fast allen europäischen Ländern (CHESTER 1891, ROSTRUP 1893, PRILLIEUX und DELACROIX 1894, SORAUER 1896, PETHYBRIDGE 1914). In der Gegenwart ist die Krankheit in allen sellerieanbauenden Ländern der Erde anzutreffen (GRAM und WEBER 1952, WALKER 1952).

Die Mehrzahl der Arbeiten über die *Septoria*-Krankheit des Selleries beschäftigt sich nur mit den verschiedenen Möglichkeiten, wie die Krankheit durch Maßnahmen des Pflanzenschutzes bekämpft werden kann[2]). Die immer wieder auftretenden Ertragsverluste durch *Septoria*-Befall (HAHN 1954) zeigen aber, daß dadurch allein die Gefährdung des Sellerieanbaus nicht zu beseitigen ist. Auch bei Sellerie wird die Züchtung resistenter Sorten, die eine Bekämpfung überflüssig machen, auf die Dauer erfolgversprechender und wirtschaftlicher sein als die beste Bekämpfungsmethode.

Zwei Arten der zu den *Fungi imperfecti* gehörenden Gattung *Septoria* sind als Erreger der Blattfleckenkrankheit bekannt: *S. apii* (Br. et Cav.) Chest. und *S. apii-graveolentis* Dorogin. Beide Pilze rufen ein ähnliches

[1]) Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 42.

[2]) ANONYM 1952, BAUDYŠ 1931, BÖNING 1933, 1935, BREMER 1931, COOK 1941, COONS 1923, ELSSMANN 1934, FLACHS 1929, KLEBAHN 1910, 1912, 1927, MIDDLETON u. a. 1952, NELSON 1939, NELSON und COCHRAN 1937, NELSON und LEWIS 1938, NEWHALL 1926, VAN POETEREN 1934, STUBBS 1945, WAGER 1952, WENCK 1939, WILSON und NEWHALL 1930.

Krankheitsbild hervor. Auf den Sellerieblättern entstehen zuerst gelblich, später bräunlich verfärbte Flecke, die allmählich an Größe zunehmen und schließlich das ganze Blatt zum Absterben bringen können. Auf den Flecken entwickeln sich die makroskopisch gerade noch sichtbaren, schwarzen, mehr oder weniger kugelförmigen Pyknidien, die Fruchtkörper des Pilzes. Unterschiede im Schadbild sind erst bei genauer Beobachtung, dann aber deutlich zu erkennen. Sie bestehen vor allem in der Größe der Blattflecken sowie in dem Zeitpunkt und dem Ort der Fruchtkörperbildung (Cochran 1932). Die beiden *Septoria*-Arten weisen außerdem einige morphologische Unterschiede auf. Die fast kugeligen Pyknidien von *Septoria apii* sind mit 65 bis 69 μ Durchmesser kleiner als die unregelmäßiger geformten Pyknidien von *Septoria apii-graveolentis* mit 73 bis 147 μ Durchmesser. Die fadenförmigen, mehrzelligen Sporen sind bei *S. apii* kürzer, schlanker und gerader (13,5 bis 34,2 $\times$ 1,0 bis 2,5 μ) als bei *S. apii-graveolentis* (22,5 bis 58,5 $\times$ 1,5 bis 3,0 μ) (Cochran 1932).

In älteren Arbeiten wird nur ein Erreger der Blattfleckenkrankheit beschrieben (Briosi und Cavarra 1890, Chester 1891, Rostrup 1893, Klebahn 1910). Erst Dorogin (1915) wies nach, daß diese Krankheit von zwei verschiedenen *Septoria*-Arten hervorgerufen werden kann. Die eine Art mit den einzeln stehenden Pyknidien und geraden Sporen war mit der bekannten *S. apii* (Br. et Cav.) Chest. identisch, die andere, mit teilweise verschmolzenen, unregelmäßiger geformten Pyknidien und längeren, etwas gekrümmten Sporen beschrieb er als neue Art, *S. apii-graveolentis* Dorogin. In der modernen, vor allem der angelsächsischen Literatur werden seitdem fast ausnahmlos zwei *Septoria*-Arten als Erreger des „late-blight" bei Sellerie angegeben (Lin 1939, Cook 1941, Kent 1941, Wager 1952), während andere Autoren, noch immer an der alten Auffassung festhalten (Böning 1935, Grove 1935, Laibach 1921, Petrak 1921, Kotte 1952, Rademacher 1954). Die Häufigkeit des Auftretens ist bei beiden Arten verschieden. Nach Angaben Cochrans (1932) und Walkers (1952) ist *Septoria apii-graveolentis* verbreiteter als *S. apii*. Selaries und Rohmer (1938) fanden im Elsaß nur *S. apii-graveolentis*.

Für unsere Untersuchungen wurden von befallenen Sellerieblättern verschiedener Standorte die Erreger isoliert. Nach dem Schadbild auf der Wirtspflanze zu urteilen, konnte es sich in allen Fällen nur um *Septoria apii-graveolentis* handeln. Die einzelnen Herkünfte wurden in der Reihenfolge der Isolierung mit fortlaufenden Nummern bezeichnet (Tab. 1).

Die Reinkulturen des Pilzes wurden auf folgende Art gewonnen: In einer feuchten Kammer aus reifen Pyknidien austretende Sporen wurden in einem Tropfen sterilen Leitungswassers aufgeschwemmt und auf einer Malzagarplatte ausgestrichen (1,25 % Liebes Malzextraktpulver, 2 % Agar). Nach mikroskopischer Prüfung konnten einzelne gekeimte Sporen isoliert und auf einen neuen Nährboden übertragen werden. Die Weiterkultur erfolgte auf dem schon genannten Malzagar oder einem Sellerieblattdekoktagar (0,25 % Sellerieblattpulver, 1,8 % Agar). Zur Gewinnung von Sporen für Infektionsversuche wurde der Pilz nach der von Sörgel (1951) entwickelten Filtrierpapiermethode auf flüssigen Nährböden, meist 0,1- bis 0,5%igen Sellerieblattdekokten kultiviert.

Nach der Isolierung konnte an Hand der Sporenmaße die Artzugehörigkeit jeder Pilzherkunft genauer bestimmt werden, als nach der bloßen Beur-

Tabelle 1
Übersicht der Pilzherkünfte

Nr.	Herkunftsort	isoliert 1953 im	Bemerkungen
1	Hecklingen	Juni	von Wildsellerie
2	Quedlinburg	August	
3	„	„	
4	„	„	von „Wiener Markt“
5	Peine	September	
6	Bari	Oktober	
7	Palermo	„	von Sellerie, der auf den Märkten dieser Orte angeboten wurde
8	Cattania	„	
9	Rom	„	
10	Quedlinburg	„	von „Invictus“

teilung des Schadbildes. Zur Ermittlung der Sporengröße wurden jeweils 500 Sporen mit Hilfe eines Abbeschen Zeichenapparates gezeichnet, die Länge der gezeichneten Sporen gemessen und unter Berücksichtigung des Vergrößerungsmaßstabes ihre wirkliche Länge errechnet. Die erhaltenen Werte bewegen sich zwischen 26,0 μ und 73,6 μ. Die Mittelwerte für je 500 Sporen liegen für die verschiedenen Herkünfte zwischen 39,9 μ und 56,3 μ. Die Sporen aller unserer Pilzherkünfte sind also wesentlich größer als die Sporen von *Septoria apii* (oberste Grenze nach Cochran 34 μ, nach Dorogin 40 μ). Sie übertreffen zum Teil sogar die Größe der Sporen von *S. apii-graveolentis* (oberste Grenze nach Dorogin 50 μ, nach Cochran 58,8 μ). Trotz dieser Differenzen kann es sich bei allen unseren Herkünften nur um *S. apii-graveolentis* handeln. Die Abweichungen in der Sporengröße sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die von uns gemessenen Sporen immer aus Reinkulturen auf 0,5 %igem Selleriedekokt, die von den beiden genannten Autoren gemessenen Sporen aber anscheinend aus Pyknidien von befallenen Sellerieblättern stammen. Eine Beeinflussung der Sporengröße und -form durch das Nährsubstrat ist eine auch bei manchen anderen Pilzen bekannte Erscheinung (Stevens und Hall 1909, Gerstner 1952, Baumann 1953).

Bei Untersuchungen über die Ursachen der Resistenz einer Kulturpflanze gegenüber pilzlichen Krankheitserregern hat es sich als zweckmäßig erwiesen, zunächst eine weitgehend resistente mit einer weitgehend anfälligen Sorte zu vergleichen (Sörgel 1952). Durch die beim feldmäßigen Anbau und bei der züchterischen Bearbeitung gesammelten Erfahrungen ist bekannt, daß die in unserem Gebiet angebauten Selleriesorten gegenüber *Septoria* verschieden stark anfällig sind (Tab. 2).

Die am wenigsten anfällige Sorte ist Wiener Markt. Stark anfällig sind Invictus und Magdeburger Markt. Für die weitere Arbeit schien es günstig, wenn die beiden zu vergleichenden Sorten auch in allen anderen Eigenschaften möglichst große Unterschiede aufwiesen. Wir wählten daher als anfällige Sorte Invictus, als weitgehend resistente Sorte Wiener Markt.

Tabelle 2 Übersicht über die zur Zeit im Gebiet

Sorten	Sortenart	Züchterische Entwicklung	Im Handel seit	Wuchstyp
Invictus	Hochzucht	Mitteldeutschland	1944	niedrig
Magdeburger Markt	Gruppensorte	„	1919	mittelhoch
Dresdener Markt	Hochzucht	Sachsen	1954	hoch
Oderdörfer	Gruppensorte	Ostdeutschland	1928	„
Wiener Markt	„	Österreich	1900	„

Der Unterschied im Anfälligkeitsgrad der beiden Sorten ist deutlich am Schadbild zu erkennen. Auf starkbefallenen Invictusblättern nehmen die Flecke große Teile der Blattspreite ein. Die Blätter sterben dadurch oft vorzeitig ab. Auf befallenen Blättern von Wiener Markt dagegen entstehen nur engbegrenzte Flecke, in denen das Gewebe eingesunken und verfärbt ist. Selten wird durch den Pilzbefall ein vorzeitiges Welken der Blätter verursacht. Auf den Blattflecken von Wiener Markt entstehen außerdem weniger Pyknidien als auf den Flecken von Invictus.

Um das Verhalten des Erregers auf Pflanzen der beiden Sorten und umgekehrt auch die Reaktion der unterschiedlich anfälligen Pflanzen auf eine Infektion unter möglichst gleichen Bedingungen zu untersuchen, wurden künstliche Infektionsversuche im Gewächshause durchgeführt. Solche Versuche sind an den beiden Selleriesorten bisher nicht beschrieben worden (BECKER und VOGEL 1950). Zuerst sollte festgestellt werden, ob die unter natürlichen Bedingungen beobachteten Anfälligkeitsunterschiede auch unter den veränderten Bedingungen im Gewächshause erhalten bleiben.

Für unsere Infektionsversuche standen kleine Gewächshauskabinen von 1,8 × 1,75 m Grundfläche zur Verfügung. In diesen Kabinen herrschte während der Versuchsdauer eine Temperatur von 20 bis 22 °C. Diese Temperatur hatte sich in einer voraufgegangenen Prüfung der Temperaturansprüche unseres Pilzes in künstlicher Kultur für Sporenkeimung, Myzelwachstum und Fruktifikation als optimal erwiesen. Für jeden Versuch wurden gleichaltrige und möglichst gleichförmig entwickelte Pflanzen beider Selleriesorten ausgewählt. Sie wurden durch Besprühen mit einer Sporensuspension infiziert. Diese Suspension wurde so eingestellt, daß sie immer die gleiche Anzahl Sporen enthielt (20 Sporen im Gesichtsfeld des Mikroskops bei 400facher Vergrößerung). Die Sporen stammten aus 15 Tage alten Kulturen des Pilzes auf 0,5%igem Selleriedekokt. Diese Sporen wiesen die größte Infektiosität auf. Mit zunehmendem Alter der Kulturen nahm die Befallskraft der Sporen ab. In allen Versuchen wurden Sporen der Herkunft 3 verwendet. In den Fällen, in denen auch Sporen anderer Herkünfte in die Versuche einbezogen wurden, ist ausdrücklich darauf hingewiesen. Nach dem Infizieren wurden die Pflanzen in feuchten Kammern unter Glasglocken gehalten. Die Fruktifikationszeit von *S. apii-graveolentis* bestimmte die Versuchsdauer. Die Versuche wurden in der Regel 15 Tage nach dem Infizieren abgebrochen. Für die quantitative Bestimmung des Anfälligkeitsgrades der Pflanzen benutzten wir die Zahl der in einer bestimmten Zeit auf der Flächeneinheit gebildeten Fruchtkörper des Pilzes. SÖRGEL (1956) hat ein entsprechendes Verfahren als den exaktesten Maßstab für den Anfälligkeitsgrad von Erbsen gegenüber *Mycosphaerella* und *Ascochyta* ermittelt. Die Beobachtung, daß auf Wiener Markt auf den einzelnen Blattflecken weniger Pyknidien entstehen als auf denen von Invictus, führte dazu, dieses Verfahren auch bei unseren Untersuchungen anzuwenden. Mit Hilfe eines Binokularmikroskopes wurden nach Abschluß der

der DDR zugelassenen Selleriesorten *Tabelle 2*

Blatt-		Anfälligkeit gegen *Septoria*	Knollenqualität	
Farbe	Fiederung		innere	äußere
grün	fein	stark	sehr gut	sehr gut
„	mittelgrob	„	gut	gut
„	„	mittelstark	„	befriedigend
dunkelgrün	„	gering	befriedigend	„
hellgrün	grob	sehr gering	„	„

Versuche auf jeder Pflanze die Fruchtkörper ausgezählt. Durch Ausmessen mit dem Planimeter wurde außerdem die Größe der Blattfläche ermittelt. Aus der Pyknidienzahl und der Flächengröße berechneten wir die Zahl der durchschnittlich auf jeden mm^2 der Blattfläche gebildeten Pyknidien. Diesen Wert bezeichnen wir im folgenden als Pyknidiendichte.

In drei aufeinanderfolgenden Versuchen wurden 2, 4 und 6 Monate alte Pflanzen beider Selleriesorten künstlich infiziert. Alle Versuche erstreckten sich über jeweils 15 Tage und zeigten bei ihrem Abschluß ein grundsätzlich gleiches Bild. Auf den Blättern der Invictus-Pflanzen waren viele große Flecke entstanden, die von zahlreichen Pyknidien bedeckt und umgeben waren. Auch die Pflanzen der resistenteren Sorte wiesen Blattflecke auf. Diese waren jedoch kleiner als die auf der anfälligen Sorte. Die Zahl der Fruchtkörper war deutlich geringer als auf der anfälligen Sorte (Tab. 3).

Tabelle 3

Mittlere Pyknidiendichte auf verschieden alten Pflanzen in drei gestaffelt durchgeführten Infektionsversuchen

Alter der Pflanzen	Invictus	Wiener Markt	W.% v. I.	P%
2 Monate	2,26	1,08	46,8	0,1
4 Monate	0,93	0,35	37,6	0,86
6 Monate	0,35	0,06	17,1	1,15

Die Zahlen der Pyknidiendichten sind Mittelwerte von je 10 Pflanzen. Der Unterschied in der Pyknidiendichte zwischen beiden Sorten ist statistisch gesichert.

Die bekannte Anfälligkeit der Sorte Invictus und die Widerstandsfähigkeit der Sorte Wiener Markt gegenüber *Septoria apii-graveolentis* bleibt, wie die Versuche zeigten, auch bei künstlicher Infektion unter den gleichmäßigen, die Pilzentwicklung begünstigenden Bedingungen im Gewächshause erhalten.

Daraus kann man den Schluß ziehen, daß die Anfälligkeit bzw. Widerstandsfähigkeit der Pflanzen nicht nur oder zumindest nicht primär von Außenbedingungen abhängig sein kann.

Aus Tabelle 3 geht weiter hervor, daß die Befallsdichten mit zunehmendem Alter der Pflanzen abnehmen. Die Versuche waren im Abstand von je-

weils 2 Monaten durchgeführt worden. Um eventuelle Verschiedenheiten in den Versuchsbedingungen auszuschließen, untersuchten wir außerdem verschieden alte Pflanzen zu gleicher Zeit. Dazu wurden je 5 Pflanzen in drei Altersstufen (1,5, 4 und 7 Monate) künstlich infiziert. Nach 15 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und für jede Pflanze die Pyknidiendichte bestimmt (Tab. 4).

Tabelle 4

Mittlere Pyknidiendichte auf verschieden alten, gleichzeitig infizierten Pflanzen

Alter der Pflanzen	Invictus	Wiener Markt	W. % von I.
1,5 Monate	1,67	0,42	25,14
4 „	1,47	0,04	2,74
7 „	1,08	0,02	2,02

Dieser Versuch führte zu annähernd gleichen Ergebnissen wie die vorangegangenen: Die Anfälligkeit nimmt mit zunehmendem Alter der Pflanzen ab, und zwar bei der resistenteren Sorte schneller als bei der anfälligen. Wenn auch die Zahlen — absolut betrachtet — in beiden Versuchen voneinander abweichen, so ist die Tendenz doch die gleiche.

Zusammenfassend können wir daher feststellen, daß

1. junge Pflanzen — unabhängig von der Sorte — im Infektionsversuch anfälliger sind als ältere und daß
2. dieser Unterschied bei der resistenteren Sorte stärker ausgeprägt ist als bei der anfälligeren.

Eine solche Beziehung zwischen der Befallsstärke und dem Alter müßte sich auch bei verschieden alten Blättern ein und derselben Pflanze nachweisen lassen. Es zeigte sich in unseren Versuchen, daß zwischen den einzelnen Blättern einer Pflanze tatsächlich Unterschiede in der Befallsdichte vorhanden sind. Sie sind aber nicht in jedem Falle statistisch zu sichern. Trotzdem läßt sich eine Tendenz zu stärkerem Befall der jungen Blätter einer Pflanze nachweisen. Auch hier ist sie bei den Pflanzen der resistenteren Sorte stärker ausgeprägt als bei denen der anfälligen. Als Beispiel seien die Pyknidiendichten der einzelnen, aufeinanderfolgenden Blätter von vier Monate alten, künstlich infizierten Pflanzen angeführt (Tab. 5).

Es ist bemerkenswert, daß außer den jüngsten auch die ältesten, schon vergilbten Blätter stärkeren Pyknidienbesatz aufweisen als alle übrigen. Die Zunahme der Befallsstärke von den älteren zu den jüngeren Blättern bezieht sich nur auf die grünen Blätter einer Pflanze.

Wir können also unsere Feststellung dahingehend erweitern, daß auch Blätter verschiedenen Alters an ein und derselben Pflanze bei künstlicher Infektion unterschiedlich stark befallen werden.

Bei allen bisherigen Versuchen ist die Anzahl der Fruchtkörper nur einmal, und zwar in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium festgestellt wor-

den. Damit ist von dem sich über Tage erstreckenden Vorgang der Ausbreitung und Reproduktion des Pilzes auf der Wirtspflanze nur ein einziger Zeitpunkt erfaßt. An diesem ist die Pyknidiendichte auf beiden Selleriesorten deutlich verschieden. In einigen weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt auf beiden Selleriesorten zuerst ein Unterschied in der Entwicklung des Pilzes auftritt.

Tabelle 5

Mittlere Pyknidiendichte der einzelnen Blätter von 5 Pflanzen nach 15tägiger Versuchsdauer
1 = ältestes Blatt, 7 = jüngstes Blatt

Blatt/Sorte	Invictus	Wiener Markt
1	1,39	0,18
2	1,40	0,04
3	0,43	0,17
4	0,71	0,34
5	0,65	0,49
6	0,69	0,55
7	1,07	0,71

Wir bestimmten deshalb zunächst den Beginn der Fruchtkörperbildung auf beiden Selleriesorten. Dazu wurden 20 abgeschnittene Blätter jeder Sorte künstlich infiziert. Vom fünften Versuchstage an wurden die Ober- und Unterseiten der Blätter auf ihren Pyknidienbesatz untersucht. Am siebten Tage nach dem Infizieren waren die ersten Fruchtkörper zu beobachten. Bei Invictus wiesen 6 Blätter Pyknidien auf, während bei Wiener Markt erst auf einem Blatt Pyknidien entwickelt waren. Nach 9 Tagen waren bei Invictus auf sämtlichen Blättern Pyknidien vorhanden. Bei Wiener Markt war das erst nach 11 Tagen zu beobachten. Zu einem besseren Vergleich wurde für jeden Tag der Prozentsatz der Blätter bestimmt, auf denen der Pilz fruktifizierte, und auf graphischem Wege ermittelt, nach welcher Zeit 25, 50 und 75 % der untersuchten Blätter Pyknidien aufwiesen. Es zeigte sich, daß die 25 %-Grenze bei der anfälligen Sorte um 1,4 Tage früher erreicht war als bei der resistenteren. Bis zum Erreichen der 50 %-Grenze vergrößerte sich der Abstand zwischen beiden Sorten auf 2,2 Tage und bis zum Erreichen der 75 %-Grenze auf 2,5 Tage. Um zufällige Abweichungen auszuschalten, betrachten wir den Zeitpunkt, an dem 50 % der Blätter Pyknidien aufweisen als den „Beginn der Fruktifikation". Wir können dann bei der resistenteren Sorte eine Verlängerung der Fruktifikationszeit von 2,2 Tagen gegenüber der anfälligen feststellen.

Es folgt daraus, daß die Bildung von Fortpflanzungsorganen auf der weitgehend resistenten Sorte gegenüber der anfälligen verzögert einsetzt.

Diese Verlängerung der Fruktifikationszeit allein erscheint zu geringfügig, um den nach 15tägiger Versuchsdauer vorhandenen Unterschied in der

Pyknidienzahl auf den beiden Selleriesorten zu erklären. Es ist vielmehr anzunehmen, daß außerdem auch die Anzahl der in einer bestimmten Zeit gebildeten Fruchtkörper auf der resistenteren Sorte geringer ist als auf der anfälligen. Zur Klärung dieser Frage wurde die tägliche Zunahme der Pyknidienzahl auf künstlich infizierten Pflanzen beider Sorten ermittelt.

Von jeder Sorte wurden zehn etwa 10 Wochen alte Pflanzen im Gewächshause infiziert. Ein mittleres Blatt jeder Pflanze wurde vom sechsten Versuchstage an täglich auf Pyknidienbesatz untersucht, ohne das Blatt von der Pflanze zu lösen. Am 13. Versuchstage wurde die Fläche der Spreite von jedem Blatt gemessen. Auf diesen Wert wurden die an jedem Tage ermittelten Pyknidienzahlen bezogen, um daraus die Pyknidiendichte zu berechnen.

Es zeigte sich, daß auf der resistenteren Sorte nicht nur die Fruktifikations z e i t verlängert, sondern auch die Fruktifikations i n t e n s i t ä t herabgesetzt ist. Die mittlere Pyknidiendichte aller 10 Pflanzen stieg während der Versuchszeit auf der resistenteren Sorte dauernd langsamer an als auf der anfälligeren (Abb. 1).

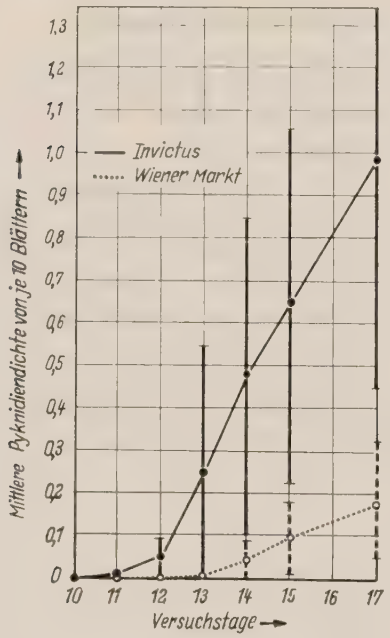


Abb. 1. Mittlere Pyknidiendichte mit Angabe der Streuungsbreite von je 10 Blättern künstlich infizierter Pflanzen von Invictus und Wiener Markt

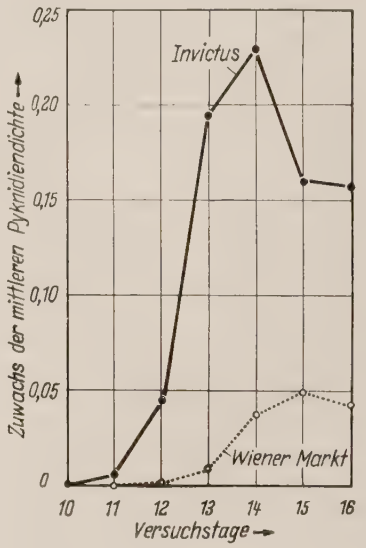


Abb. 2. Täglicher Zuwachs der mittleren Pyknidiendichte auf 10 Blättern künstlich infizierter Pflanzen von Invictus und Wiener Markt

Der Unterschied in der Pyknidiendichte ist demnach nicht nur in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, sondern von Beginn der Pyknidienbildung an zu beobachten. Außerdem ist der tägliche Zuwachs der Pyknidiendichte auf der anfälligeren Sorte beträchtlich größer als auf der resistenteren (Abb. 2).

Diese Ergebnisse deuten sämtlich darauf hin, daß die Reproduktion von *Septoria apii-graveolentis* auf der weitgehend resistenten Sorte gehemmt und nicht nur verlangsamt ist.

Bemerkenswert ist, daß sich die Hemmwirkung nicht nur auf die Geschwindigkeit und Häufigkeit der Fruchtkörperbildung erstreckt, sondern auch in einer Verkleinerung der Fruchtkörper zum Ausdruck kommt. Vergleicht man die Größen reifer Pyknidien von künstlich infizierten Pflanzen beider Selleriesorten, so zeigt sich zwischen diesen ein deutlicher, statistisch gesicherter Unterschied. Die Fläche des optischen Querschnitts betrug bei Pyknidien auf Invictus im Mittel von 750 Messungen 7073 μ^2, bei Pyknidien auf Wiener Markt nur 5310 μ^2 (Abb. 3).

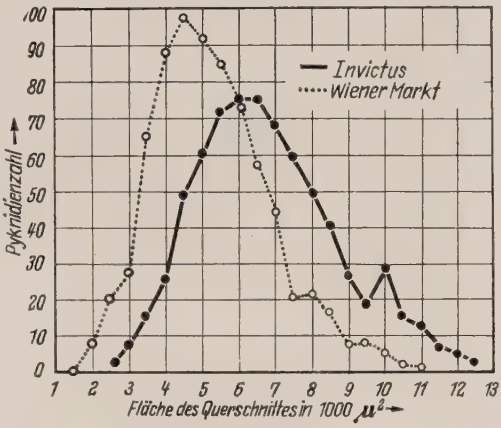


Abb. 3. Fläche des optischen Querschnitts von Pyknidien von künstlich infizierten Pflanzen der Sorten Invictus und Wiener Markt

Zusammenfassend können wir also feststellen, daß auf der wenig anfälligen Selleriesorte die Fruchtkörper von *Septoria apii-graveolentis* später, in geringerer Zahl und von geringerer Größe ausgebildet werden als auf der anfälligen Sorte.

Wie die Versuche zeigten, ist eine Hemmung bei der Ausbildung der Fruchtkörper bereits sehr frühzeitig vorhanden. Es wäre daher denkbar, daß schon die der Fruktifikation vorausgehende vegetative Entwicklung des Pilzes gehemmt wird. Von einigen Pilzen ist bekannt, daß die Bildung von Fruchtkörpern außer von Umweltbedingungen auch von dem Alter und der Menge des Myzels abhängig ist (Falck 1913, Fischer und Gäumann 1929, Wakefield 1909). Unterschiede in der Myzelentwicklung könnten die Unterschiede in der Fruchtkörperbildung erklären.

An Hand von Blattquerschnitten künstlich infizierter und natürlich befallener Blätter ließ sich nachweisen, daß im Gewebe aller Blätter der wenig anfälligen Sorte offensichtlich weniger Hyphen vorhanden sind als in denen der anfälligen Sorte (Abb. 4).

Bei Invictusblättern sind in der Nähe der meist in Gruppen stehenden Pyknidien die Zellen des Blattgewebes von einem dichten Hyphengeflecht umsponnen. Bei den Blättern von Wiener Markt führen zu den meist einzeln ausgebildeten Pyknidien nur wenige und kurze Hyphenstränge hin. Diese Beobachtungen machen eine enge Beziehung zwischen der Stärke der Myzelentwicklung in den Blättern und der Fruchtkörperbildung wahrscheinlich. Daraus ergibt sich weiter, daß zwischen der Myzelentwicklung des Pilzes und der Anfälligkeit der Wirtspflanze Zusammenhänge bestehen.

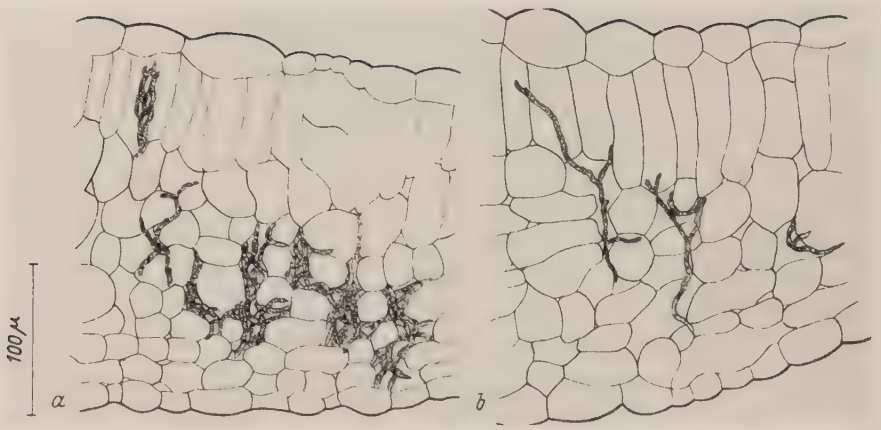


Abb. 4. Myzelentwicklung von *Septoria apii-graveolentis* im Blattgewebe von a) Invictus, b) Wiener Markt

Möglicherweise ist die geringe Myzelentwicklung durch eine Verzögerung oder Hemmung der Sporenkeimung bedingt. Es wurde deshalb zunächst die Keimung der Sporen von *Septoria apii-graveolentis* auf den Blättern beider Selleriesorten untersucht.

Da eine direkte Beobachtung des Keimvorganges methodische Schwierigkeiten bot, wurden von der Ober- und Unterseite der infizierten Blätter Kollodiumhäutchen hergestellt. Sie gaben die Abdrücke der Epidermiszellen und der daraufliegenden Sporen deutlich wieder und ermöglichten eine genaue Zählung der Sporen und ein relativ leichtes Erkennen ihres Keimungszustandes. In regelmäßigen Zeitabständen wurden von mehreren Blättern insgesamt 1000 Sporen ausgezählt und der Prozentsatz der gekeimten Sporen bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Sporen auf den Blättern von Invictus und Wiener Markt unter Gewächshausbedingungen mit annähernd gleicher Geschwindigkeit und Stärke keimen (Tab. 6).

Tabelle 6

Prozentsatz der nach verschiedenen Zeitabständen auf den Blättern der beiden Selleriesorten gekeimten Sporen von *Septoria apii-graveolentis*

Std.	Blattoberseite		Blattunterseite		Gesamt	
	Inv.	Wien.	Inv.	Wien.	Inv.	Wien.
48	55,2	60,0	56,8	47,8	56,0	53,5
72	79,4	78,2	85,6	78,2	82,5	78,2
96	88,0	80,3	82,5	82,9	85,3	81,6
120	90,1	91,9	95,3	85,4	92,7	88,7

Die von der wenig anfälligen Sorte ausgehende Hemmwirkung muß also erst in einem späteren Entwicklungsstadium des Pilzes wirksam werden. Das könnte bereits beim Eindringen der Keimhyphen in das Blattgewebe geschehen. Wie aus der Literatur (COCHRAN 1932) und aus eigenen Untersuchungen

hervorgeht, sind die Keimschläuche von *Septoria apii-graveolentis* nicht auf die Stomata als Eintrittspforten in das Wirtsgewebe angewiesen, sondern dringen auch direkt durch die Epidermiszellen ein. Der Vorgang des Eindringens und die Zahl der eingedrungenen Hyphen lassen sich schwer auf der Pflanze direkt beobachten. Wir versuchten deshalb, indirekt vom äußerlich sichtbaren Schadbild auf die Menge der eingedrungenen Hyphen zu schließen.

Bei künstlichen Infektionen entstanden auf den Blättern der wenig anfälligen Sorte neben wenigen größeren auch sehr viele kleine, oft schwer erkennbare Flecke. Das Blattgewebe war an diesen Stellen etwas eingesunken und schwach verfärbt. Pyknidien waren auf den kleinen Flecken nicht zu beobachten. Nichtinfizierte und nur mit Wasser besprühte Pflanzen wiesen solche Flecke nicht auf. Es ist daher anzunehmen, daß auch die kleinen Flecke durch eine Infektion hervorgerufen werden. Im Freiland wiesen natürlich infizierte Pflanzen von Wiener Markt ebenfalls viele, aber engbegrenzte Befallsstellen auf. Auf Invictus-Pflanzen waren die Flecke in beiden Fällen größer.

In einem Infektionsversuch wurde außer der Pyknidienzahl auch die Zahl der Blattflecke ermittelt und analog der Pyknidiendichte die Fleckendichte errechnet (Tab. 7).

Tabelle 7

Fleckendichte auf künstlich infizierten Pflanzen von Invictus und Wiener Markt nach 15tägiger Versuchsdauer

Pflanze	Invictus	Wiener Markt	W. % von I.
1	0,09	0,15	175,8
2	0,10	0,13	122,1
3	0,13	0,17	129,5
4	0,13	0,22	172,1
5	0,11	0,18	161,8
6	0,13	0,12	92,3
7	0,11	0,16	154,7
Mittelwert	0,11	0,16	144,1

Es zeigt sich, daß die Fleckendichte auf Invictus sogar etwas geringer ist als auf Wiener Markt. Das ist aber dadurch zu erklären, daß auf Invictus oft mehrere einzelne Flecke zu einem größeren zusammenfließen. Verschieden ist also auf künstlich infizierten Pflanzen der beiden Sorten nicht so sehr die Anzahl als vielmehr die Größe der Blattflecke.

Aus diesen Beobachtungen kann man folgern, daß der Pilz in die Blätter der wenig anfälligen Sorte ebenso wie in die der anfälligen einzudringen und dort eine Schädigung des Gewebes hervorzurufen vermag. Unterschiedlich ist bei beiden Sorten aber die Größe der Blattflecke, die wahrscheinlich durch die Ausbreitung des Myzels im Blattgewebe bestimmt wird.

Wir können also annehmen, daß der von der wenig anfälligen Sorte ausgehende hemmende Einfluß nicht schon beim Eindringen der Keimhyphen, sondern erst bei der Ausbreitung des Myzels im Blattgewebe wirksam wird. Die Hemmung der Myzelausbreitung führt dann zu der beobachteten geringeren Myzelmenge und damit zu schwächerer Fruktifikation. Zwischen der Myzelausbreitung und der anatomischen Struktur des Blattgewebes ließen sich bisher keine direkten Beziehungen nachweisen. Es lag daher nahe, die Ursachen für die Hemmung der Pilzentwicklung auf der resistenteren Pflanze in ungünstigen Ernährungsbedingungen zu suchen. Zusammenhänge zwischen Ernährung und Myzelentwicklung sowie Fruktifikation sind bereits bei vielen Pilzen bekannt (HAWKER 1950). Es ist denkbar, daß der Erreger auf der wenig anfälligen Pflanze nicht genügend oder ungeeignete Nährstoffe vorfindet oder durch einen spezifischen Hemmstoff an der vollen Ausnützung der vorhandenen Nährstoffe gehindert wird. Um diesen Fragen nachzugehen, untersuchten wir die Entwicklung des Pilzes in künstlicher Kultur auf Extrakten von Pflanzen der beiden Selleriesorten.

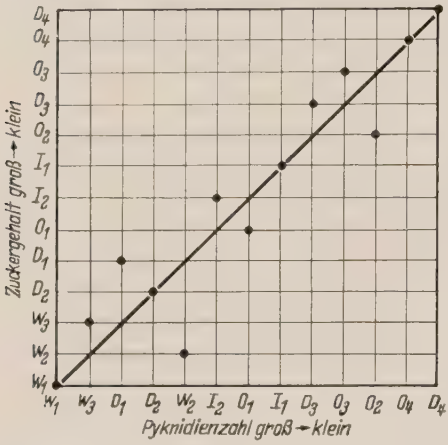


Abb. 5. Beziehung zwischen dem Zuckergehalt von Knollendekokten und der Pyknidienzahl bei künstlicher Kultur des Pilzes auf diesen Dekokten.

W = Wiener Markt, I = Invictus, O = Oderdörfer, D = Dresdener Markt. 1—4 = Nummer der Knollen

Bei der Kultur auf Sellerieknollendekokten zeigte sich zwar eine klare Abhängigkeit der Fruchtkörperzahl vom Kohlenhydratgehalt des Dekokts, aber keine Beziehung zwischen der Pyknidienzahl und dem Resistenzgrad der lebenden Pflanzen. In den Versuch wurden außer Invictus und Wiener Markt noch die beiden Sorten Oderdörfer und Dresdner Markt einbezogen, die in ihrer Anfälligkeit eine Mittelstellung zwischen den beiden erstgenannten einnehmen (Abb. 5).

Auch bei der Kultur auf Dekokten aus getrockneten und frischen Blättern sowie auf Blattpreßsäften ließen sich in zahlreichen Versuchen keine Parallelen zwischen dem Resistenzgrad der lebenden Pflanze und der Fruchtkörperzahl in der entsprechenden künstlichen Kultur nachweisen.

LANGENBUCH und HEILING (1941) haben auf gekochten Knollenstücken Unterschiede im Myzelwachstum von *Septoria apii* festgestellt, die den Resistenzunterschieden der grünen Pflanzen entsprechen. Da wir mit anderen Selleriesorten und anderen Pilzherkünften arbeiteten, ist ein unmittelbarer Vergleich nicht möglich. Der Resistenzunterschied zwischen Invictus und Wiener Markt ließ sich aber auch bei Anwendung der von den genannten Autoren angegebenen Methode auf Knollenstücken nicht nachweisen.

Bei der bisherigen Arbeit ist einseitig die Anfälligkeit der Wirtspflanze und der Anfälligkeitsunterschied zwischen den beiden Wirtspflanzensorten beachtet worden. Alle anderen am Zustandekommen der Krankheit beteiligten Faktoren wurden möglichst konstant gehalten. In einigen weiteren Versuchen sollte nun der Einfluß der Aggressivität des Pilzes auf die Befallsstärke untersucht werden. Nach GÄUMANN (1951) besteht die Aggressivität eines Erregers in seiner Fähigkeit, die Wirtspflanze anzugreifen, in sie einzudringen, sie zur eigenen Ernährung zu benutzen und sich in oder auf ihr zu vermehren. Unterschiede in der Aggressivität können durch verschiedene Kulturbedingungen hervorgerufen werden. Sie können auch bei den verschiedenen Herkünften des Erregers von vornherein gegeben sein. Wir prüften einige unserer Pilzherkünfte auf etwa vorhandene Unterschiede ihrer Aggressivität.

Gleich alte und möglichst gleichförmig entwickelte Pflanzen der beiden Selleriesorten wurden im Gewächshause mit Sporen der verschiedenen Pilzherkünfte infiziert. Alle Herkünfte waren seit ihrer Isolierung auf Malzagar gehalten und für die Sporengewinnung auf 0,5%igen Sellerieblattdekokt übertragen worden. Auf Grund der GÄUMANNschen Definition haben wir auch die Aggressivität des Pilzes durch die auf der Wirtspflanze erreichte Pyknidiendichte gemessen (Tab. 8).

Tabelle 8

Pyknidiendichte auf Pflanzen von Invictus und Wiener Markt infiziert mit Sporen verschiedener Pilzherkünfte 15 Tage nach dem Infizieren

Herkunft	Invictus	Wiener Markt	W. % von I.
6	1,400	0,878	62,67
7	1,225	0,515	41,87
8	0,304	0,081	27,68
2	0,217	0,059	27,01
3	0,350	0,060	19,63
5	0,456	0,090	17,62
1	0,373	0,067	17,19
10	0,512	0,077	15,01
4	0,177	0,010	5,65

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Pyknidiendichten auf den mit verschiedenen Herkünften infizierten Pflanzen einer Sorte stark voneinander abweichen. Die einzelnen Pilzherkünfte müssen demnach verschieden stark aggressiv sein. Die Pyknidiendichte auf einer mit dem aggressivsten Erreger infizierten Pflanze der wenig anfälligen Sorte übersteigt die Pyknidiendichte auf einer mit dem am wenigsten aggressiven Erreger infizierten Pflanze der anfälligen Sorte beträchtlich. Auch die Größe des Befallsunterschieds zwischen den beiden Sorten ist von der Aggressivität des Pilzes mitbestimmt. Bei einer Infektion mit den aggressivsten Pilzherkünften ist der Befallsunterschied beträchtlich geringer als bei einer Infektion mit einem mittelstarken oder schwach aggressiven Erreger (s. Tab. 8).

Besonders hervorzuheben ist, daß die beiden aggressivsten Pilzherkünfte 6 und 7 von befallenen Sellerieblättern aus Italien isoliert wurden (s. Tab. 1).

Die beobachtete „Anfälligkeit" der im mitteleuropäischen Anbaugebiet widerstandsfähigsten Sorte Wiener Markt gegenüber diesen Herkünften läßt vermuten, daß die Widerstandsfähigkeit dieser Sorte nur in dem Gebiet besteht, in dem sie angebaut und züchterisch bearbeitet wird. Widerstandsfähig ist Wiener Markt wahrscheinlich nur gegenüber den in diesem Gebiet vorkommenden „Rassen" von *Septoria apii-graveolentis*. Unsere Vermutung bleibt noch durch die Prüfung einer größeren Anzahl von Pilzherkünften aus verschiedenen Gebieten zu bestätigen. Auffällig ist aber, daß schon von den vier in Italien wahllos gesammelten Blättern zwei Erreger gefunden wurden, die allen Quedlinburger Herkünften überlegen sind.

Unsere Versuche zeigen also, daß bei Infektionen mit unterschiedlich aggressiven Pilzherkünften die Stärke des Befalls auf Pflanzen gleicher Anfälligkeit verschieden ist. Die Befallsstärke ist somit nicht nur von dem Anfälligkeitsgrad der Wirtspflanze, sondern auch von der Aggressivität des Pilzes abhängig. Bei besonders hoher Aggressivität kann der Unterschied in der Befallsstärke zwischen der anfälligen und der wenig anfälligen Sorte wesentlich verkleinert sein. Auch der Unterschied im Befall zwischen den beiden Sorten ist demnach mit von der Aggressivität der Pilzherkunft abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von *Septoria apii-graveolentis* auf zwei unterschiedlich anfälligen Selleriesorten untersucht. Dabei konnten wir feststellen, daß sowohl die vegetative als auch die reproduktive Phase auf der wenig anfälligen Sorte gegenüber der anfälligen deutlich gehemmt ist. Diese Hemmung zeigt sich in einer schwächeren Myzelentwicklung, in einer etwas verlängerten Fruktifikationszeit und in einer geringeren Fruktifikationsintensität. Die Keimung der Sporen und das Eindringen der Keimhyphen in die Blätter verlaufen aber bei beiden Sorten ohne sichtbaren Unterschied. Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Hemmwirkung erst bei der Ausbreitung des Myzels im Blattgewebe angreift.

Die resistentere Sorte weist, wie anfangs erwähnt (s. Tab. 2), eine gröbere äußere Blattstruktur auf als die anfällige. Böning (1935) beschreibt eine ähnliche Erscheinung auch von anderen, älteren Sorten. Man könnte danach eine mechanische Behinderung der Myzelausbreitung durch die anatomische Struktur des Blattgewebes vermuten, wie sie z. B. von Hawkins und Harvey (1919) für die Ausbreitung von *Pythium de Baryanum* in resistenten Kartoffelknollen und von Hursh (1924) bei der Ausbreitung des Myzels von *Puccinia graminis* in Weizenhalmen beschrieben wird. An Blattquerschnitten ließen sich aber bisher zwischen den beiden Sorten keine Unterschiede feststellen, die eine solche Annahme rechtfertigten. Die Beobachtung, daß vergilbte Blätter der wenig anfälligen Sorte ihre Widerstandsfähigkeit weitgehend eingebüßt haben und dem Pilz ein stärkeres Fruktifizieren gestatten als grüne, intakte Blätter, deutet vielmehr auf einen Einfluß physiologischer Unterschiede hin.

Bei künstlicher Kultur des Pilzes auf Blattextrakten ließen sich solche Unterschiede bisher nicht nachweisen. Qualitative oder quantitative Verschie-

denheiten im Nährstoffgehalt, z. B. im Gehalt an Kohlenhydraten, ähnlich denen, die GRAINGER (1956) bei unterschiedlich anfälligen Hafer- und Kartoffelpflanzen und SÖRGEL (1956) bei verschieden stark anfälligen Erbsensorten beobachteten, dürften daher bei unseren Selleriesorten für die Resistenzunterschiede nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein. Auch bei papierchromatographischen Untersuchungen der Blattextrakte ließen sich weder im Zucker- noch im Aminosäuregehalt Abweichungen feststellen.

Bei einer Reihe von Kulturpflanzen konnte die Widerstandsfähigkeit gegen bestimmte Parasiten auf das Vorkommen von Hemmstoffen zurückgeführt werden (RANKER 1930, TURNER 1953, 1956, SIEBS 1955, SÖRGEL 1956). Über den Einfluß von Hemmstoffen auf die Entwicklung des Pilzes in der resistenten Selleriesorte, lassen die Kulturversuche allein keine eindeutige Aussage zu. Da diese Stoffe so labil sein können, daß sie bei der Herstellung und Sterilisierung der Extrakte zerstört werden (GOTHOSKAR 1955), sprechen die negativen Ergebnisse unserer Kulturversuche nicht unbedingt gegen das Vorhandensein und den möglichen Einfluß von Hemmstoffen. Biochemische Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen und anderer, die sich aus der gegenseitigen Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge zwischen Pilz und Wirtspflanze ergeben, stehen noch aus.

Nach den bisherigen Ergebnissen geht der hemmende Einfluß nur von der lebenden Pflanze und in voller Stärke nur von der intakten Pflanze aus. Es ist demnach auch möglich, daß die Hemmung auf besonders starke Abwehrreaktionen der lebenden Wirtszelle zurückzuführen ist und sich daher losgelöst von der lebenden Pflanze gar nicht darstellen läßt. Ein solches Verhalten ist bei verschiedenen Kulturpflanzen vor allem beim Befall mit obligaten Parasiten bekannt (GÄUMANN 1951). SKOROPAD und ARNY (1956) führen aber auch die Resistenz von Gerste gegenüber *Helminthosporium gramineum* und PIERSON und WALKER (1954) die von Gurken gegenüber *Cladosporium cucumerinum*, auf „host-parasite-interactions" zurück, obwohl es sich in beiden Fällen nicht um obligate Parasiten handelt. Ob solche Verhältnisse auch bei den *Septoria*-resistenten Selleriepflanzen vorliegen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Herrn Prof. Dr. G. BECKER möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und sein ständiges Interesse an ihrem Fortgang herzlich danken. Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. G. SÖRGEL für seine Hilfe und mannigfache Unterstützung sowie für die Überlassung des Pilzmaterials aus Italien.

Zusammenfassung

Es wurde die Entwicklung von *Septoria apii-graveolentis* auf zwei, beim Anbau im Freiland unterschiedlich resistenten Selleriesorten — der sehr anfälligen Sorte Invictus und der wenig anfälligen Sorte Wiener Markt — untersucht. Dabei zeigte sich:

1. Die Fruktifikationsintensität des Pilzes geht dem Anfälligkeitsgrad der Selleriepflanze parallel und kann deshalb zu dessen quantitativer Bestimmung herangezogen werden.

2. Der Anfälligkeitsunterschied zwischen den beiden untersuchten Selleriesorten bleibt auch bei künstlicher Infektion im Gewächshause erhalten.

3. Junge Pflanzen sind unabhängig von der Sorte im künstlichen Infektionsversuch anfälliger als ältere Pflanzen.

4. Die Herabsetzung der Fruktifikationsintensität des Pilzes auf künstlich infizierten Pflanzen der wenig anfälligen Sorte macht sich durch eine geringe Verlängerung der Fruktifikationszeit, eine Verminderung der Pyknidienzahl und eine Verkleinerung der Pyknidien bemerkbar.

5. Die Myzelentwicklung ist in den Blättern der wenig anfälligen Sorte gehemmt, obwohl die Keimung der Sporen auf beiden Selleriesorten mit gleicher Geschwindigkeit und Häufigkeit vor sich geht und auch dem Eindringen der Keimhyphen auf den Blättern der wenig anfälligen Sorte anscheinend kein größerer Widerstand entgegengesetzt wird als auf denen der anfälligen Sorte.

6. Bei künstlicher Kultur des Erregers auf verschieden hergestellten Extrakten aus Blättern und Knollen beider Selleriesorten lassen sich keine Unterschiede in der Pyknidienbildung nachweisen, die den auf dem natürlichen Substrat beobachteten entsprechen.

7. Die von natürlich befallenen Sellerieblättern aus verschiedenen Orten isolierten Herkünfte des Pilzes unterscheiden sich in ihrer Aggressivität. Zwei stark aggressive Herkünfte aus Italien vermögen auch die gegenüber Quedlinburger Herkünften wenig anfällige Sorte Wiener Markt im künstlichen Infektionsversuch stark zu befallen.

Summary

The causes of the differential resistance of two different varieties of celeriac

Investigations were made on the development of *Septoria apii-graveolentis* on two celeriac varieties differing in resistance under conditions of cultivation in the open, the very susceptible variety Invictus and the resistant variety Wiener Markt. The following results were obtained:

(1) The intensity of fructification of the fungus runs parallel to the degree of susceptibility of celeriac and can thus be employed for its quantitative determination.

(2) The difference in susceptibility of the two celeriac varieties investigated is maintained in artificial infections in the greenhouse.

(3) Young plants are, regardless of variety, more susceptible in artificial infection experiments than older plants.

(4) The reduction of the intensity of fructification of the fungus in artificially infected plants of the less susceptible variety is expressed in a slight extension of the fructification time, a reduction in the number of pycnidia and their smaller size.

(5) Mycelial development is inhibited in the leaves of the less susceptible variety, though the germination of the spores occurs with the same speed

and frequency on both celeriac varieties and the penetration of the germ hyphae also seems to meet no greater resistance on the leaves of the less susceptible variety than on those of the susceptible variety.

(6) In artificial cultures of the pathogen on extracts of leaves and tubers prepared in different ways from the two celeriac varieties no differences were detectable in pycnidial formation corresponding to those on the natural substrate.

(7) Strains of the fungus isolated from naturally infected celeriac leaves from different localities differ in aggressivity. Two highly aggressive strains from Italy are capable of producing strong infections on the variety Wiener Markt, which is relatively resistant to the strains from Quedlinburg.

Literaturverzeichnis

Anonym, 1952: Sprays and dusts cut damage to celery. Seed World **71**, 41.

Baudyš, E., 1931: Die Blattfleckenkrankheit der Sellerie. Nachr. Schädlingsbekämpfung **6**, 54—55.

Baumann, G., 1953: Untersuchungen zur Biologie von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. Kühn-Archiv **67**, 305—383.

Becker, G., und P. Vogel, 1950: Sellerie. Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. **5**, 391—420, Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Böning, K., 1933: Versuche zur Bekämpfung der *Septoria*-Blattfleckenkrankheit des Selleries mit chemischen Mitteln. Prakt. Blätt. Pflanzenschutz **11**, 231—237.

— —, 1935: Die Blattfleckenkrankheit des Selleries und ihre Bekämpfung. Obst- u. Gemüsebau **81**, 155—156.

Bremer, H., 1931: Blattfleckenkrankheit oder „Rost" des Sellerie. Obst- u. Gemüsebau **77**, 94.

Briosi, A., e Cavarra, 1890: I Funghi Parassiti delle Piante coltivate o utili. Fasc. VI, Nr. 144, zit. in Laibach, F., 1921.

Chester, F. D., 1891: A leafspot of celery. Bull. Torrey Bot. Club **18**, 372—373.

Chupp, C., 1925: Manual of vegetable-garden diseases. McMillan Co., New York.

Cochran, L. G., 1932: A study of two *Septoria* leaf spots of celery. Phytopathology **22**, 791—813.

Cook, H. T., 1941: Late blight of celery in Virginia. Plant Dis. Reptr. **25**, 311—313.

Coons, G. H., 1923: Celery blight or leaf spot. Mich. Agr. Exp. Stat. Quart. Bull. **5**, 130.

Desmazières, 1823: Cat. des plantes omis 1823, p. 25.

Dorogin, G., 1915: Melanose des Sellerie. Mat. Mikol. i. Fitopatol. Ross. **1**, 57—76 (russ.), zit. in Cochran, L. G., 1932.

Elssmann, E., 1934 a: Bekämpfung der *Septoria*-Blattfleckenkrankheit des Selleries mit Kupfermitteln. Obst- u. Gemüsebau **80**, 67—68.

— —, 1934 b: Die Bekämpfung der Blattfleckenkrankheit des Selleries. Z. Pflanzenkrankh. **44**, 192—205.

Falck, R., 1913: Die Fruchtkörperbildung der im Hause vorkommenden holzzerstörenden Pilze in Reinkulturen und ihre Bedingungen. Mykol. Unters. u. Ber. Heft 1, 47—67.

Fischer, E., und E. Gäumann, 1929: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Gustav Fischer, Jena.

Flachs, K., 1929: Die *Septoria*-Blattfleckenkrankheit des Selleries und ihre Bekämpfung. Prakt. Blätt. Pflanzenschutz **6**, 93.

FRESENIUS, 1863: Beiträge zur Mycologie **3**, 91—94.

GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel.

GERSTNER, W., 1952: Untersuchungen über die Biologie des Sellerieschorfes (*Phoma apiicola* Klebahn). Wiss. Z. d. Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg, math.-naturw. Reihe **2**, 83—126.

GOTHOSKAR, S. S., 1955: Further studies on the nature of *Fusarium* resistance in tomato. Phytopathology **45**, 303—307.

GRAINGER, J., 1956: Host nutrition and attack by fungal parasites. Phytopathology **46**, 445—456.

GRAM, A., and A. WEBER, 1952: Plant diseases in orchard, nursery and garden crops. Macdonald & Co., London.

GROVE, W. B., 1935: British Stem- and Leaf Fungi, Vol. I. Cambridge at the University Press.

HAHN, P., 1954: Ertragsschwankungen der Selleriesorten und einige Ursachen. Dtsch. Gartenbau **2**, 289—294.

HAWKER, L. E., 1950: Physiology of Fungi. University of London Press Ltd., London.

HAWKINS, L. A., and R. HARVEY, 1919: Physiological study of the parasitism of *Pythium de Baryanum* on the potato tuber. J. Agr. Res. **18**, 275—297.

HURSH, C. R., 1924: Morphological and physiological studies on the resistance of wheat to *Puccinia tritici*. J. Agr. Res. **27**, 381—412.

KENT, N. L., 1941: The influence of Lithium salts on certain cultivated plants and their parasitic diseases. Ann. Appl. Biol. **28**, 189—209.

KLEBAHN, H., 1910: Krankheiten des Selleries. Z. Pflanzenkrankh. **20**, 1—40.

— —, 1912: Bericht über die in den Jahren 1908 bis 1912 zur Erforschung und Bekämpfung der Selleriekrankheiten in den Hamburger Marschlanden angestellten Untersuchungen und Versuche. 3. Beih. Jb. Hamburger Wiss. Anst. 30.

— —, 1927: Bekämpfung der Selleriekrankheiten. Kranke Pflanze **4**, 19.

KOTTE, W., 1952: Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau und ihre Bekämpfung. Paul Parey, Berlin und Hamburg.

LAIBACH, F., 1921: Untersuchungen über einige *Septoria*-Arten. IV. *Septoria apii* und *Septoria petroselini*. Z. Pflanzenkrankh. **31**, 161—195.

LANGENBUCH und HEILING, 1941: Zur Prüfung der Resistenz von Sellerie gegen *Septoria apii*. Mitt. Biol. Reichsanstalt Heft 65, 68—69.

LIN, K. H., 1939: The number of spores in the pycnidia of *Septoria apii*. Phytopathology **29**, 646.

MIDDLETON, J. T., J. B. KENDRICK and B. J. HALL, 1952: Parasitic and non-parasitic diseases of celery in southern California. Plant. Dis. Reptr. **36**, 188.

NELSON, R., 1939: Tests of new dusts and liquid fungicides in 1938 for control celery leaf blights. Mich. Agr. Exp. Stat. Quart. Bull. **19**, 159—162.

— —, and L. C. COCHRAN, 1937: Comparative effectiveness of copper dusts in the control of celery leaf blights in 1936. Mich. Agr. Exp. Stat. Quart. Bull. **19**, 159—162.

— —, and R. W. LEWIS, 1938: Comparisons of fungicides for control of celery leaf blights. Mich. Agr. Exp. Stat. Quart. Bull. **20**, 210—221.

NEWHALL, A. G., 1926: The importance of controlling celery blight in the seedbed. Phytopathology **16**, 467—472.

PETHYBRIDGE, G. H., 1914: The possible source of origin of the spot disease of celery. J. Roy. Hort. Soc. **40**, 476—480.

PETRAK, F., 1921: Mycologische Notizen. II. *Septoria apii*. Ann. Mycol. **19**, 31—32.

PIERSON, C. F., and J. C. WALKER, 1954: Relation of *Cladosporium cucumerinum* to susceptible and resistant cucumber tissue. Phytopathology **44**, 459—465.

van Poeteren, N., 1934: Bestrijding van de bladvlekkziekten bij Knolselderie. T. plantenziekt. **40**, 153.

Prillieux, E., et G. Delacroix, 1894: Sur quelques champignons nouveaux ou peu connus parasites sur les plantes cultivées. Bull. Soc. Mycol. France **10**, 161—182.

Rademacher, B., 1954: Krankheiten und Schädlinge im Acker- und Feldgemüsebau. Eugen Ulmer, Stuttgart.

Ranker, E. R., 1930: The nature of smut resistance in certain selfed lines of corn as indicated by filtration studies. J. Agr. Res. **41**, 613—619.

Reinhold, J., 1939: Zuchtziele im Gemüsebau. Forschungsdienst **8**, 287—298.

Rostrup, E., 1893: Gardeners Tidende, p. 180, nach Rostrup, Plantepatologi 1902, 564 bis 566, zit. in Klebahn, H., 1910.

Selaries et Rohmer, 1938: La septoriose du céleri en Alsace. Ann. Epiphyt. Phytogen. n. s. **4**, 485—493.

Siebs, E., 1955: Untersuchungen über die Schorfresistenz von Birnen. III. Stofflicher Hinweis auf die Grundlagen der Blattschorfresistenz. Phytopath. Z. **23**, 37—49.

Skoropad, W. R., and D. C. Arny, 1956: Histological expression of susceptibility and resistance in barley to strains of *Helminthosporium gramineum*. Phytopathology **46**, 289—292.

Sörgel, G., 1951: Über eine neue Kulturmethode für Mikroorganismen. Züchter **21**, 322 bis 324.

— —, 1952: Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz verschiedener Erbsensorten gegenüber den Fußkrankheitserregern *Ascochyta pisi* Lib., *Ascochyta pinodella* Jones und *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. Züchter **22**, 4—26.

— —, 1956: Die Problematik der bisherigen Vorstellungen über die Resistenz gegen pilzliche Krankheitserreger, erläutert am Beispiel der Fuß- und Fleckenkrankheit der Erbsen. Sitzungsberichte der DAL zu Berlin, **5**, Heft 16.

Sorauer, P., 1896: Die Fleckenkrankheit des Sellerie. Z. Pflanzenkrankheiten **6**, 191—192.

Stevens, F. L., and J. C. Hall, 1909: Variation of fungi due to environment. Bot. Gaz. **48**, 1—30.

Stubbs, L. L., 1945: The control of celery leaf spot in commercial nurseries. J. Dept. Agr. Victoria **43**, 335—336.

Turner, E. M., 1953: The nature of resistance of oats to the take-all fungus. I. J. Exp. Bot. **4**, 264—271.

— —, 1956: The nature of the resistance of oats to the take-all fungus. II. J. Exp. Bot. **7**, 80—93.

Wager, V. A., 1952: Leaf spot disease of celery. Fmg. S.-Afr. **27**, 335—336.

Wakefield, E. M., 1909: Über die Bedingungen der Fruchtkörperbildung bei Hymenomyceten. Nat. wiss. Z. Forst- u. Landw. **7**, 521—527.

Walker, J. C., 1952: Diseases of vegetable crops. Book-Company McGraw-Hill, New York, Toronto, London.

Wenck, F., 1939: Lohnt sich die Bekämpfung der Blattfleckenkrankheit beim Sellerie? Obst- und Gemüsebau **85**, 30.

Wilson, J. D., and A. G. Newhall, 1930: The control of celery blights. Ohio Agr. Exp. Stat. Bull. 461, 1—30.

Kurze Mitteilung

Aus der Biologischen Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,
Institut für Phytopathologie Aschersleben

Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.)

Von

H. Kegler

Mit einer Abbildung

In Wäldern des Erzgebirges, des Harzes, Brandenburgs und Mecklenburgs wurden an verschiedenen Stellen Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) gefunden, deren Blätter hellgrüne, ring-, flecken- oder bandartige Verfärbungen aufwiesen. Die kranken Pflanzen kamen vereinzelt oder auch nesterweise gehäuft vor. Die Symptome wurden sowohl an jungen, ein- bis zweijährigen als auch an mehr als zehnjährigen Pflanzen festgestellt. Die gleichartig an den erkrankten Pflanzen auftretenden Erscheinungen ließen den Verdacht des Vorliegens einer Viruskrankheit aufkommen. Zum Nachweis der Virose wurden Übertragungsversuche eingeleitet.

Methodik und Ergebnisse

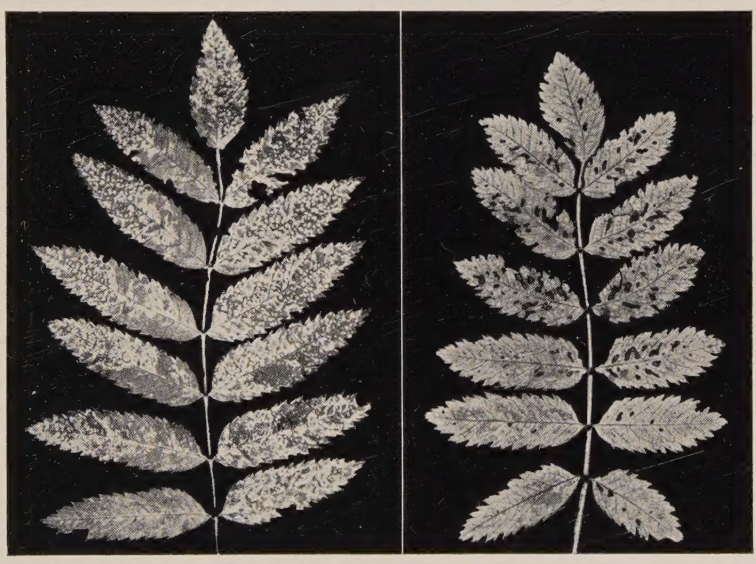
Zur Übertragung wurden einjährige Triebe kranker Pflanzen verwendet. Von ihnen wurden Rindenschildchen auf gesunde einjährige Ebereschensämlinge bzw. einjährige Triebe von Edelebereschenhochstämmen gepfropft (chip budding).

Am 4. Juni 1957 wurden auf diese Weise zwei etwa zehnjährige gesunde Edelebereschen mit je fünf Rindenschildchen gepfropft, die von kranken Pflanzen aus dem Erzgebirge (Oberbärenburg) stammten. An den Blättern der künstlich infizierten Triebe traten im Frühjahr 1958 die gleichen Symptome auf wie sie an den Ebereschen im Erzgebirge beobachtet wurden. Von den

infizierten Trieben wurden am 9. Mai 1958 Übertragungen auf weitere vier Ebereschen vorgenommen, die im Frühjahr 1959 ebenfalls Symptome zeigten.

Am 19. Mai 1958 wurden sieben gesunde Ebereschen mit je fünf Rindenschildchen von Trieben kranker Pflanzen aus dem Harz (Ballenstedt) und am 22. Mai 1958 fünf gesunde Ebereschen von kranken Pflanzen aus Mecklenburg (Umgebung von Ludwigslust) gepfropft. Im Frühjahr 1959 traten an sieben der zwölf infizierten Ebereschen deutliche Symptome auf.

Auf Grund der Übertragungsversuche ist das Ringfleckenmosaik der Eberesche als eine Viruskrankheit anzusehen. Die Symptome traten stets erst in dem auf die Infektion folgenden Jahre nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von mehr als zehn Monaten auf. Wenige Tage nach der Laubentfaltung erschienen sie zunächst als tupferartige hellgrüne Flecke auf den Fiederblättchen. Später bildeten sich zahlreiche hellgrüne Bänder, Flecke oder Ringe, deren Durchmesser oft nur wenige Millimeter betrug. Hierdurch erhielten die Blätter eine von weitem deutlich erkennbare Marmorierung. Oft traten zusätzlich hellbraune, dunkel umrandete Nekrosen auf, die gelegentlich ausbrachen (Abb.).



Links: Ringfleckenmosaik an *Sorbus aucuparia* L. Rechts: Nekrosen und schwache hellgrüne Fleckung nach Übertragung durch Rindenpfropfung.
Infektion: 19. Mai 1958; Aufnahme: 22. Mai 1959

Die Krankheitserscheinungen sind im Jahre nach der Infektion in der Regel nur an Blättern der infizierten Triebe bzw. oberhalb der Infektionsstellen zu erkennen. Erst in folgenden Jahren erscheinen sie auch an anderen Teilen der Baumkrone. Vermutlich erfolgt die Ausbreitung des Virus von der Infektionsstelle her sehr langsam.

Diskussion

Im Jahre 1907 berichtete BAUR bereits über eine durch Pfropfung übertragbare „Buntblättrigkeit" an *Sorbus aucuparia* L. BAUR beschrieb die Symptome wie folgt: „Die Blätter sind hier ganz normal dunkelgrün, nur die Spitzen der Zähnchen des Blattrandes sind intensiv gelb. Ziemlich selten kommen jedoch auch Blätter vor, bei denen größere Teile der Spreite gelbfleckig sind." Dieser Schilderung zufolge ist es wenig wahrscheinlich, daß es sich um die gleiche Erscheinung handelt, wie sie oben beschrieben wurde. Die Verfärbung der Blätter geht beim Ringfleckenmosaik nicht vom Rande aus, sondern erscheint in der Regel auf der gesamten Spreite der Fiederblätter. Ausgesprochene Gelbfleckung wurde in keinem Falle beobachtet.

Eine mit dem Ringfleckenmosaik offenbar identische Krankheit fand JAMALAINEN (1957) in Finnland. Sie ist dort häufig anzutreffen; ihre Virusnatur wurde vermutet.

Die Untersuchungen über diese Virose werden fortgesetzt.

Literaturverzeichnis

BAUR, E., 1907: Über infektiöse Chlorosen bei *Ligustrum, Laburnum, Fraxinus, Sorbus* und *Ptelea*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **25**, 410—413.

JAMALAINEN, E. A., 1957: Virustaudeita ja virustautien kaltaisista kasvitaudeista suomessa. Valtion maatalouskoetoiminnau julk. Nr. 158.

Die Kulturpraxis der Schnittblumen und Topfpflanzen

Lehr- und Handbuch für den neuzeitlichen Gärtnereibetrieb

Von C. Reiter und F. Böhmig

8., von F. Böhmig neubearbeitete Auflage. 1958.

690 Seiten mit 602 Abbildungen. Ganzleinen DM 64,—

Ein bewährtes Standardwerk, das in hervorragendem Maße den Belangen des in der praktischen Arbeit stehenden Blumen- und Zierpflanzengärtners gerecht wird. Bei den in Deutschland vorkommenden Hauptkulturen sind die Kulturmaßnahmen ausführlich erörtert. Die leichtverständliche und übersichtliche Darstellung auch der technischen Einrichtungen und des Pflanzenschutzes wird durch instruktives Abbildungsmaterial anschaulich ergänzt.

„Der Inhalt des gut bebilderten Werkes bringt in ausführlichster Darstellung nicht nur die Kulturmaßnahmen der gebräuchlichsten Kalt- und Warmhauspflanzen bzw. Freilandgewächse, sondern auch die Düngung in allen Phasen, ein umfassendes Kapitel über den neuesten Stand des Pflanzenschutzes und alles Wissenswerte über die technischen Einrichtungen eines neuzeitlichen Gartenbaubetriebes. Mehr kann ein solches Buch wohl kaum bieten."

Gartenzeitung, Wien

Wir empfehlen zum Bezug:

Der Erwerbsobstbau

Berichte aus Wissenschaft und Praxis

Herausgegeben von den Professoren

P.-G. de Haas, F. Hilkenbäumer, E. Kemmer, G. Liebster, E. L. Loewel und C. F. Rudloff

Als vor Jahresfrist das erste Heft der Zeitschrift DER ERWERBSOBSTBAU erschien, war noch nicht abzusehen, welcher Erfolg der Neugründung beschieden sein würde. Nachdem nun der erste Jahrgang vorliegt, beweisen ständig steigende Abonnentenzahl und Leserzuschriften aus allen Kreisen, daß die Zeitschrift ein lebhaftes Echo gefunden hat.

Die von den Leitern aller Obstbauinstitute der Hochschulen der Bundesrepublik und Westberlins sowie der Obstbauversuchsanstalt Jork herausgegebene Zeitschrift sieht ihre Aufgabe darin, das obstbauliche Wissen des In- und Auslandes dem deutschsprachigen Erwerbsobstbauer nahezubringen. Aufsätze aus Wissenschaft und Praxis, veranschaulicht durch Abbildungen, Übersichten und Tabellen, befassen sich mit der Vielfalt der Probleme innerhalb des Erwerbsobstbaues. Etwa 20 Kurzberichte je Heft berichten über wichtige obstbauliche Beiträge in in- und ausländischen Blättern; Buchbesprechungen verweisen auf wertvolle Neuerscheinungen auf dem Büchermarkt.

Erscheinungsweise: monatlich. Umfang des Heftes: 20 Seiten, zuzügl. Umschlag, im Format DIN A 4. Bezugspreis: vierteljährl. DM 12,— zuzügl. amtl. Postgebühren. Einzelheft DM 5,—

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Wir liefern aus:

Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur 1952

Herausgegeben von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem

Bearbeitet von Reg.-Rat Dr. J. BÄRNER

1959. 474 Seiten. Broschiert DM 43,—

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem

1958/59 erschienen folgende Hefte:

Heft 92 **Bericht über die in den Jahren 1955 und 1956 durchgeführten Gemeinschaftsuntersuchungen zum Auf- bzw. Ausbau eines Blattlauswarndienstes im Rübenbau**
Von Dr. W. STEUDEL und Dr. P. BLAESEN
1958. 37 Seiten. Kartoniert DM 4,50

Heft 93 **Lepidopteren-Puppen an Obstgewächsen und ihrer näheren Umgebung**
Versuch einer Bestimmungsübersicht
Von Dr. W. SPEYER
1958. 40 Seiten mit 91 Abbildungen. Kartoniert DM 4,50

Heft 94 **Rückstände von Pflanzenschutz- und Vorratsschutzmitteln,** von sonstigen Schädlingsbekämpfungs- und Unkrautbekämpfungsmitteln sowie von Mitteln zur Beeinflussung des Pflanzenwachstums
Literaturübersicht zusammengestellt von Ob.-Reg.-Rat Dr. H. ZEUMER
1958. 124 Seiten. Kartoniert DM 11,—; einseitig bedruckte Ausgabe DM 15,—

Heft 95 **Zur Toxikologie der Insektizide**
Literaturübersicht 1. Teil: Diën-Gruppe
Von Dr. P. STEINER und Dr. W. GRUCH
1959. 118 Seiten mit 42 Tabellen. Kartoniert DM 9,70

Heft 96 **Biologische Untersuchungen über die Entwicklung von *Hylotrupes bajulus* L. (Hausbockkäfer)**
1959. 35 Seiten mit 7 Abbildungen und 15 Tabellen. Kartoniert DM 3,60

Heft 97 **32. Deutsche Pflanzenschutz-Tagung** der Biologischen Bundesanstalt in Hannover, 6. bis 10. Oktober 1958
1959. 262 Seiten mit 79 Abbildungen und 4 Kunstdrucktafeln. Kart. DM 12,80

Weitere Hefte dieser Schriftenreihe erscheinen in zwangloser Folge. Über die Hefte 1 bis 91 der „Mitteilungen" erteilen wir auf Anfrage genaue Auskünfte.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG